N° A.O. 6904

THESE

PRESENTEE

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS VII

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

(mention Sciences Appliquées)

par

Gérard Marc SIMONNET

ETUDE DE L'ACTION LETHALE DE LA CANAVANINE SUR ESCHERICHIA coli

Soutenue le 4 janvier 1972, devant la Commission d'Examen

MM. F. CHAPEVILLE — Président

J.M. DUBERT
P. FROMAGEOT — Examinateurs

N° A.O. 6904

THESE

PRESENTEE

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS VII

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES
(mention Sciences Appliquées)

par

Gérard Marc SIMONNET

ETUDE DE L'ACTION LETHALE DE LA CANAVANINE SUR ESCHERICHIA coli

Soutenue le 4 janvier 1972, devant la Commission d'Examen

MM.	F. CHAPEVILLE	Président
	J.M. DUBERT	Examinateurs
	P. FROMAGEOT	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Monsieur F. CHAPEVILLE, Professeur à la Faculté des Sciences, Université de Paris 7, qui a suggéré et guidé ce travail, j'adresse l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur P. FROMAGEOT, Chef du Service de Biochimie du Commissariat à l'Energie Atomique, pour s'être toujours intéressé à mes travaux.

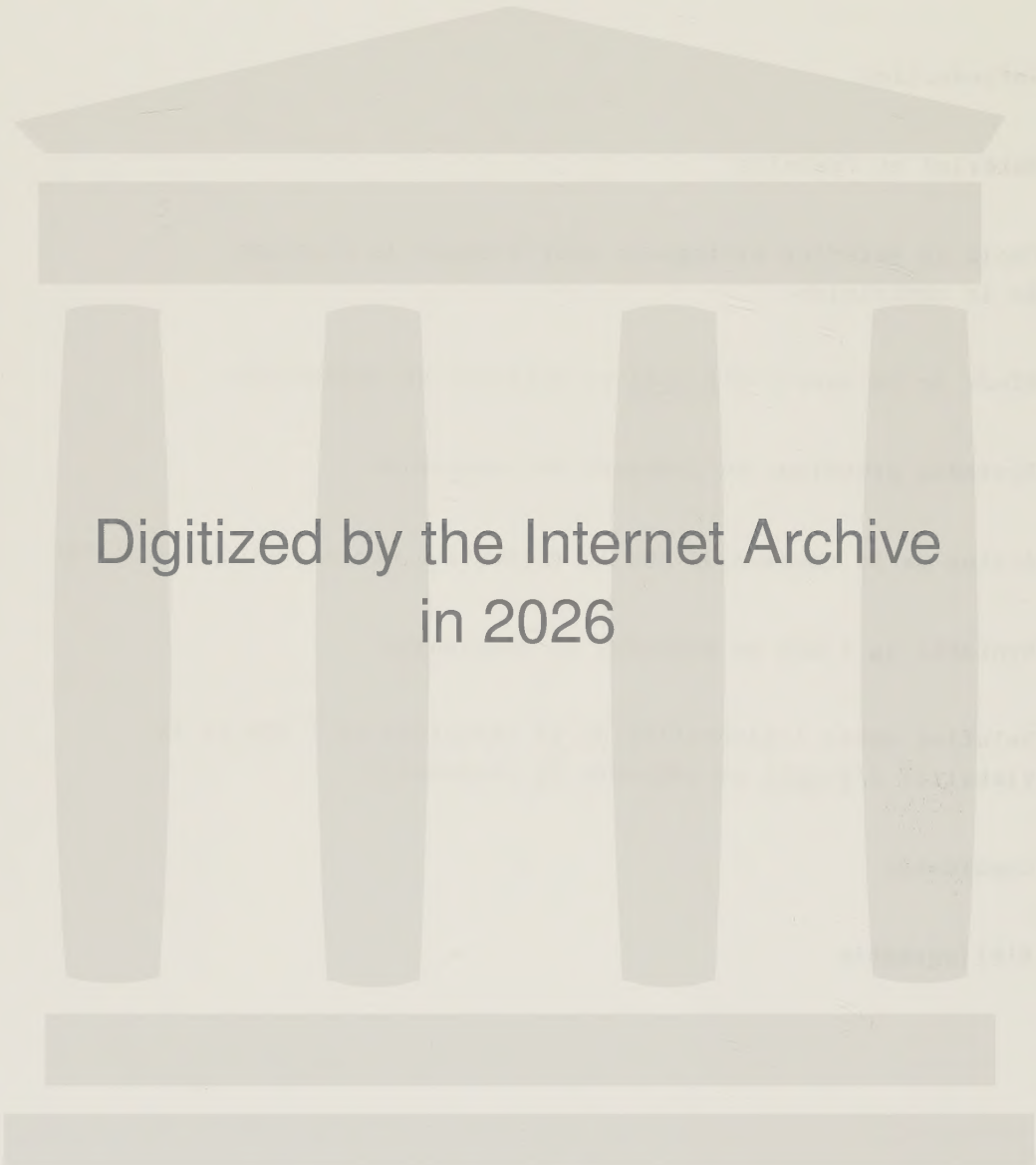
A Monsieur le Professeur DUBERT qui a bien voulu faire partie du Jury, j'adresse l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier Monsieur Et. BAUER, Adjoint au Directeur de l'I.N.S.T.N. de l'intérêt qu'il a porté à la réalisation de ce travail.

Je remercie Madame Michelle PARESYS-RICHLI ainsi que tous les membres du Laboratoire de Radiobiologie de l'I.N.S.T.N. pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

SOMMAIRE

	Pages
I - Introduction	7
II - Matériel et Produits	9
III - Choix du Matériel biologique pour l'étude de l'action de la canavanine	11
IV - Etude de la survie d'E.coli en présence de canavanine	25
V - Synthèse protéique en présence de canavanine	33
VI - Action de la canavanine sur la régulation de la synthèse de l'ARN	39
VII - Synthèse de l'ADN en présence de canavanine	55
VIII - Relation entre l'altération de la structure de l'ADN et la viabilité d'E.coli en présence de canavanine	63
Conclusion	77
Bibliographie	81


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552727_0031

ETUDE DE L'ACTION LETHALE DE LA CANAVANINE SUR ESCHERICHIA coli

I - INTRODUCTION

Parmi les substances qui possèdent une action inhibitrice de la croissance cellulaire, on rencontre de nombreux analogues structuraux des métabolites essentiels, en particulier des acides aminés. RICHMOND (1962) a recensé quelques trente huit analogues de dix acides aminés qui présentent des propriétés antimétaboliques. L'action inhibitrice des analogues s'explique en général par une compétition de ceux-ci avec l'acide aminé naturel. L'analogue pouvant soit s'incorporer à la place de l'acide aminé naturel, en donnant des protéines dont certaines sont biologiquement inactives ou encore, l'analogue, bien que ne s'incorporant pas dans les protéines, inhibe l'incorporation de l'acide aminé naturel et bloque ainsi la synthèse de certaines protéines.

Si, après un traitement par un analogue qui a bloqué la croissance et la division cellulaire, on fournit à nouveau l'acide aminé naturel, la croissance et la division cellulaire reprennent. C'est le cas pour tous les analogues étudiés, sauf pour la Canavanine, analogue structural de l'arginine.

L'inhibition, par la canavanine, de la division cellulaire est irréversible, c'est-à-dire que le traitement par cet analogue entraîne une perte de viabilité des cellules. Du fait de la particularité de l'action de la canavanine, on comprend tout l'intérêt que peut présenter l'étude du mécanisme de l'action de la canavanine sur le métabolisme et la division cellulaire.

La canavanine (acide L-α amino-δ-guanidoxybutyrique) est un acide aminé naturel qui se différencie de l'arginine simplement par le remplacement d'un groupe méthylène par de l'oxygène.

La canavanine a été découverte dans différentes espèces de Canavalia par KITAGAWA et TOMIYAMA (1929) ; KITAGAWA (1937), DAMODARAN et NARAYANAN (1939), puis identifiée et isolée dans des graines de légumineuses par FEARON et BELL (1955) ; BELL (1958) ; BELL (1960).

L'action inhibitrice de la L-canavanine sur la croissance de différents types cellulaires a été mise en évidence (HOROWITZ et SRB, 1948 ; VOLCANI et SNELL, 1948 ; RICHMOND, 1962 ; SCHWARTZ et MAAS, 1960). Les premières études ont été faites par HOROWITZ et SRB (1948) qui ont montré l'effet inhibiteur de la canavanine sur la croissance de Neurospora. VOLCANI et SNELL (1948) ont observé une inhibition de la

croissance de différentes bactéries lactiques et d'Eschérichia coli.

SCHWARTZ et MAAS (1960) analysant les cinétiques d'inhibition, par la canavanine, de la croissance d'E. coli, ont conclu que l'action de cet analogue n'était pas due à une interférence sur la biosynthèse de l'arginine, mais était le résultat d'une inhibition de l'incorporation de l'arginine dans les protéines. Ce modèle de mécanisme de l'action d'un analogue structural d'acide aminé avait été décrit par COHEN (1958) ; COHEN et MUNIER (1959).

L'incorporation de canavanine dans les protéines de staphylococcus a été mise en évidence par RICHMOND (1959).

L'inhibition, par la canavanine, de la croissance in-vitro des cellules de carcinome de Walker et la compétition entre l'arginine et la canavanine ont été observées par KRUSE et Mc COY (1958). Avec le même type de cellules, KRUSE, WHITE, CARTER et Mc COY (1959) ont montré que la canavanine s'incorporait dans les protéines à la place de l'arginine.

Il revient à SCHACHTELE et ROGERS (1965) d'avoir montré que la canavanine n'avait pas seulement un effet inhibiteur sur la croissance d'E. coli mais qu'elle entraînait une perte de viabilité des cellules. Ces auteurs ont donné à cet effet léthal de la canavanine le terme de "canavanine death".

Le présent travail a pour but d'étudier l'action de la canavanine sur les différentes synthèses macromoléculaires : protéines, acides ribonucléiques et acide désoxyribonucléique, et de tenter d'expliquer par quel mécanisme la canavanine peut entraîner un effet léthal.

II - MATERIEL ET PRODUITS

II.1 - Souches de bactéries

E.coli. B arg^-. E.coli 15 thy^- arg^- ura^- RC^{str} et E.coli 15 thy^- arg^- ura^- RC^{rel} nous ont été aimablement fournies par le Docteur RASMUSSEN.

E.coli CP 79 arg^- his^- thr^- leu^- thi^- RC^{str}.

E.coli 2 000 f arg^- thr^- leu^- his^- str^r F^-.

E.coli arg^- RC^{rel} a été obtenue par croisement d'E.coli 58161 met^- RC^{rel} avec E.coli Hfr CY A 36 arg^-.

E.coli K 12 arg^-.

II.2 - Milieux de culture

a) - Milieu de conservation des souches

Nutrient Broth (Difco) 8 g, Bacto Agar (Difco) 7,6 g, thymine 80 mg pour un litre d'eau distillée.

b) - Milieu gélosé

Pour un litre d'eau bidistillée : chlorure de sodium 5 g, Nutrient Broth (Difco) 8 g, Bacto Peptone (Difco) 8 g et Bacto Agar (Difco) 14,5 g.

c) - Gélose molle

Bacto Agar (Difco) : 7,5 g par litre d'eau bidistillée.

d) - Milieu liquide minéral de Davis (1950)

Pour un litre d'eau bidistillée ; phosphate bipotassique 7 g, phosphate monopotassique 3 g, sulfate d'ammonium 1 g, citrate de sodium 3 H_2O 0,5 g, sulfate de magnésium 7 H_2O 0,1 g. Le pH est ajusté à 7.

Tous les milieux sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 30 minutes.

e) - Milieu liquide minéral de Gallant et Suskind (1962)

Pour un litre de tampon Tris H Cl 0,05 M pH 7,4 : citrate de sodium 5 H_2O : 0,5 g ; sulfate d'ammonium : 1 g ; sulfate de magnésium 7 H_2O : 8,3 ml d'une solution à 0,1 M, phosphate dipotassique 100 mg.

II.3 - Produits chimiques

L - Canavanine sulfate A. Grade et les L - acides aminés grade A, ont été fournis par CALBIOCHEM.

Les nucléosides mono, di et triphosphates, l'uracile, la déoxyguanosine, la thymidine et la thymine proviennent de P-L BIOCHEMICALS Inc.

Le PPO et le diméthyl POPOP proviennent de Merck.

II.4 - Molécules marquées

DL - Canavanine (guanido ^{14}C) 20 à 35 mCi/m M ; L. Leucine (carboxyle ^{14}C) 40 à 50 mCi/m M, Uracile (^{14}C - 2) 47,4 mCi/m M, Uridine 5' - monophosphate ^{14}C (U) 114 mCi/m M ; thymidine (méthyle ^{3}H) 1 Ci/m M, thymidine (méthyle ^{14}C) 20 mCi/m M ; proviennent du Commissariat à l'Energie Atomique, France.

Uridine 5' diphosphate : 1,76 mCi/m M proviennent de SCHWARZ, BIORESEARCH, inc.

Abréviations

E.coli 15 TAU = E.coli 15 thy^- arg^- ura^-
diméthyl POPOP = 1,4 Bis 2(4 méthyl - 5 - phényloxazolyle) benzène
PPO = 2,5 diphényloxazole
CAP = Chloramphénicol
ipm = impulsions par minute.

III - CHOIX DU MATERIEL BIOLOGIQUE POUR L'ETUDE DE L'ACTION DE LA CANAVANINE

L'étude des mécanismes des actions inhibitrices sur la croissance, et léthales de la canavanine pouvait être réalisée avec des cellules d'origines, soit animales, soit bactériennes.

Le choix d'un type de cellules devait être fait en fonction, d'une part de la sensibilité de ces cellules vis-à-vis de la canavanine et, d'autre part des possibilités des cellules à utiliser la canavanine comme substrat pour leurs synthèses protéiques. Ces deux conditions sont évidemment liées à la possibilité pour la canavanine de pénétrer dans les cellules et d'y être concentrée par un mécanisme de transport actif à travers la membrane cellulaire.

La première partie de ce travail a donc été de mesurer la pénétration de la canavanine dans différents types de cellules. (SIMONNET, PARESYS-RICHLI et SENTENAC, 1972).

Les types de cellules suivants ont été utilisés : des cellules d'hépatome ascitique d'Ehrlich, des érythrocytes ou des réticulocytes de lapin et des cellules bactériennes (E.coli).

Les résultats de cette étude ont montré :

a) - que dans les cellules animales, la vitesse de pénétration de la canavanine dans les cellules et son incorporation dans les protéines sont environ dix fois plus faibles que celles de l'arginine. Chez E.coli, les vitesses de pénétration de la canavanine et de l'arginine sont du même ordre.

b) - que dans les cellules d'hépatome ascitique, la canavanine inhibe de façon compétitive la pénétration de l'arginine. La canavanine pénètre à une vitesse faible dans ces cellules et sa pénétration est inhibée compétitivement par l'arginine.

MATERIEL ET METHODES

Préparation des cellules animales

a) - Cellules d'hépatome ascitique d'Ehrlich

Ces cellules sont transplantées intrapéritonéalement dans des rats adultes mâles ou femelles. Les cellules sont prélevées au 7ème jour du développement de l'ascite. Elles sont lavées deux fois, puis mises en suspension dans le milieu d'Earle (1943) à une concentration de 4 à 8.10^5 cellules/ml. Le comptage des cellules est fait à l'aide d'un hémocytomètre.

b) - Hématies et réticulocytes de lapin

Les hématies sont isolées à partir de sang de lapin, prélevé par ponction cardiaque sous anesthésie, après injection intraveineuse d'héparine (0,5 ml par kg d'animal). Les réticulocytes proviennent de lapins qui ont reçu une injection sous-cutanée quotidienne d'une solution aqueuse à 2,5 % de phénylhydrazine (pH=7). La solution de phénylhydrazine est préparée au moment de son utilisation ou bien conservée à -15°C en présence de glutathion 0,001 M (BORSOOK et col., 1952). Les animaux sont inoculés avec 0,4 ml de solution phénylhydrazine par kg d'animal, ceci pendant 5 jours.

Après prélèvement du sang, les hématies ou les réticulocytes sont isolés par centrifugation et lavés deux fois dans du liquide d'Earle, puis remis en suspension dans le même milieu en rétablissant l'hématocrite initial.

Pénétration de l'arginine ^{14}C et de la canavanine ^{14}C dans les cellules d'hépatome ascitique d'Ehrlich et sanguines de lapin

A la suspension de cellules maintenue à 23°C, au temps zéro, est introduite la L-arginine [guanido ^{14}C] à $1,5 \times 10^{-5}$ M (15 mCi/m M) ou la DL canavanine [guanido ^{14}C] à 3×10^{-5} M (30 mCi/mM). Les suspensions cellulaires sont agitées. Aux temps indiqués, 1 ml de suspension est prélevé.

Les cellules d'hépatome sont versées sur filtre millipores RA (pores de 1,2 µ de diamètre) et lavées avec 5 ml de milieu d'Earle. Les filtres sont ensuite séchés et déposés sur coupelles. Les cellules sanguines sont centrifugées, lavées une fois avec 1 ml de milieu d'Earle, puis lysées avec 1 ml d'eau. Une partie aliquote : 0,1 ml, est déposée sur coupelle et séchée.

La radioactivité des échantillons déposés sur coupelle est mesurée avec un compteur Geiger-Muller à bas bruit de fond.

Incorporation de l'arginine ^{14}C et de la canavanine ^{14}C dans les protéines des cellules d'hépatome ascitique

Le milieu d'incubation est le même que celui décrit pour suivre la pénétration des acides aminés dans ces cellules. Aux temps indiqués, 5 ml de suspension de cellules sont prélevés et centrifugés. Sur le culot de cellules, on ajoute 5 ml de TCA à 10 %. Après incubation pendant 15 minutes à 90°C, le précipité est récupéré par centrifugation, lavé deux fois avec du TCA à 10 % puis une fois avec un mélange d'éthanol et d'éther (3:1). Le précipité est dissous dans 0,5 ml d'acide formique, puis est transvasé sur coupelle. La solution est séchée et la radioactivité des échantillons est mesurée au compteur Geiger-Muller à bas bruit de fond.

Préparation et incubation des cultures de bactéries

La souche de bactéries utilisée est E.coli B arg^-, qui a été isolée à partir d'E.coli B, par irradiation au rayonnement ultraviolet et après sélection par la méthode de la pénicilline (GORINI et KAUFMAN, 1960).

Les bactéries sont incubées à 37°C en aérobie pendant une nuit dans un milieu minéral de Gray et Tatum (1964) complété avec : glucose à 0,4 % et arginine 16µg/ml. Cette culture de nuit est repiquée au 1/100 dans le même milieu et incubée pendant trois heures. Les cellules sont ensuite lavées deux fois par centrifugation à froid à 10 000 x g pendant 5 minutes avec du milieu minéral. Le dernier culot de centrifugation est remis en suspension dans le volume original de milieu minéral supplémenté avec glucose 0,4 % et arginine ^{14}C ou canavanine ^{14}C, à la concentration de 3.10^{-6} M (1 µCi/ml). Les suspensions sont incubées avec agitation à 20°C. Aux temps choisis, 1 ml de suspension est prélevé et filtré sur filtre millipore PHWP 0,45 µ, et lavé avec 4 ml de milieu minéral. Après séchage des filtres, la radioactivité des prélèvements est mesurée avec un compteur Geiger-Muller à bas bruit de fond.

Détermination du volume occupé par les cellules dans une suspension

Le volume occupé par les cellules d'hépatome ascitique est mesuré en pesant, après centrifugation, un nombre connu de cellules. Dans cette détermination, on a tenu compte de la masse du liquide extracellulaire contenu dans le culot de cellules (ROBERTS et col. 1963). Le volume occupé par les cellules sanguines est déduit de l'hématocrite.

RESULTATS

PENETRATION DANS LES CELLULES ET INCORPORATION DANS LES PROTEINES DE L'ARGININE ^{14}C ET DE LA CANAVANINE ^{14}C

1 - Cellules d'hépatome ascitique d'Ehrlich

Les figures 1 et 2 montrent la pénétration de l'arginine ^{14}C et de la canavanine ^{14}C dans les cellules d'hépatome ascitique. L'arginine pénètre rapidement à un taux beaucoup plus élevé que la canavanine.

Le calcul du rapport de la masse d'acide aminé contenue dans une unité de volume de cellules à ce même volume de milieu d'incubation fait apparaître que dans ces cellules d'hépatome, dans les conditions utilisées, la concentration interne en canavanine reste inférieure à celle du milieu. Dans le but de déterminer si la pénétration de la canavanine dans ces cellules se fait par diffusion ou par transport actif, des cellules ont été incubées en présence de canavanine ^{14}C à différentes concentrations, avec ou sans arginine. Les résultats reportés dans la figure 3 montrent que la pénétration de la canavanine est inhibée de façon compétitive par l'arginine. Ceci semble montrer que la canavanine qui pénètre dans ces cellules n'entre pas par diffusion, mais est transportée par un système de perméation. On peut penser que ce système est le même que celui qui assure le transport de l'arginine. En effet, la pénétration de cet acide aminé est inhibée compétitivement par la canavanine (figure 4).

Si la quantité de canavanine qui pénètre dans les cellules est beaucoup plus faible que celle d'arginine, cette différence peut être due à une affinité moindre du système de perméation vis-à-vis de l'analogue que de l'arginine.

La canavanine qui a pénétré dans les cellules est largement incorporée dans les protéines (figure 5).

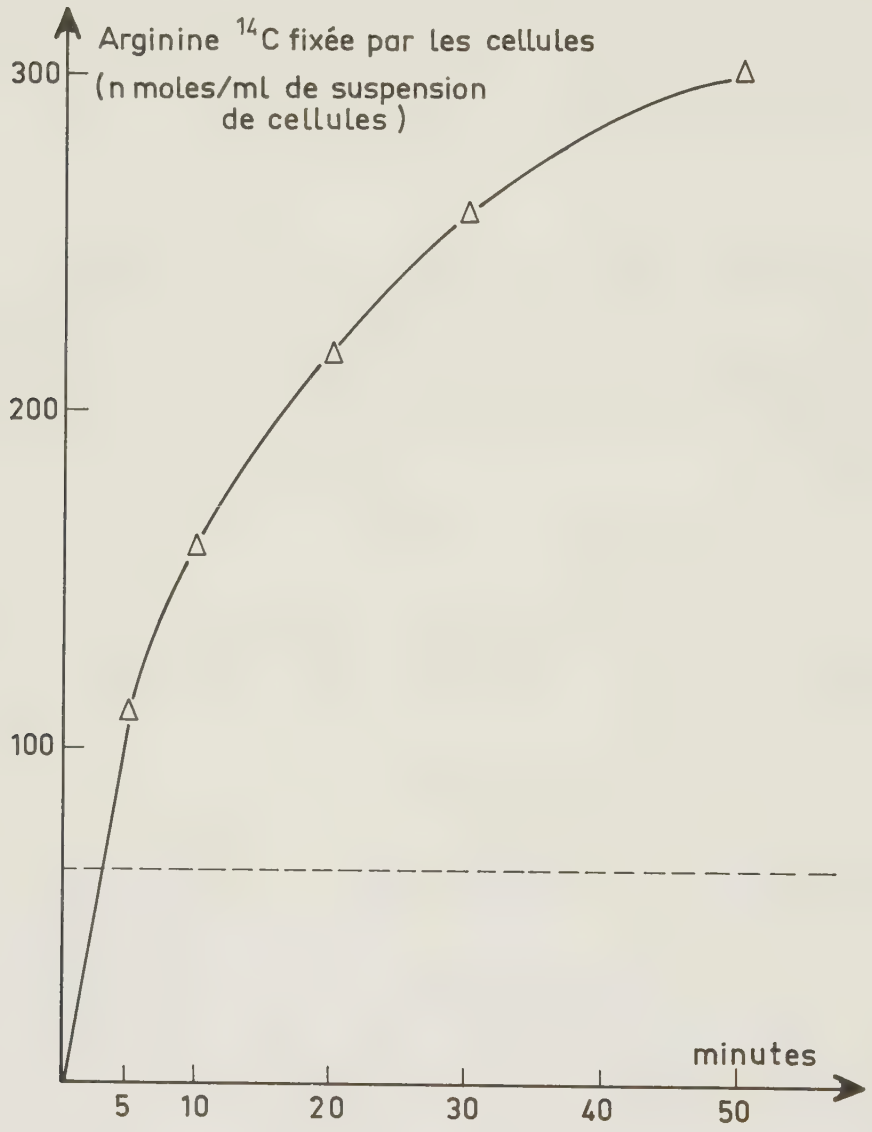


Figure 1 - Pénétration de l'arginine dans les cellules d'hépatome ascitique.

Une suspension de cellules (5×10^5 cellules/ml) est incubée à 23°C, en présence d'arginine ^{14}C $1,5 \times 10^{-5}$ M (Δ). Aux temps indiqués, 1 ml de suspension est prélevé et la quantité d'acide aminé qui a pénétré dans les cellules est mesurée.

Le niveau de la ligne en tirets (---) représente la valeur de l'équilibre de concentration en acide aminé entre le milieu d'incubation et les cellules. Le calcul de cette valeur tient compte du volume occupé par les cellules dans 1 ml de suspension.

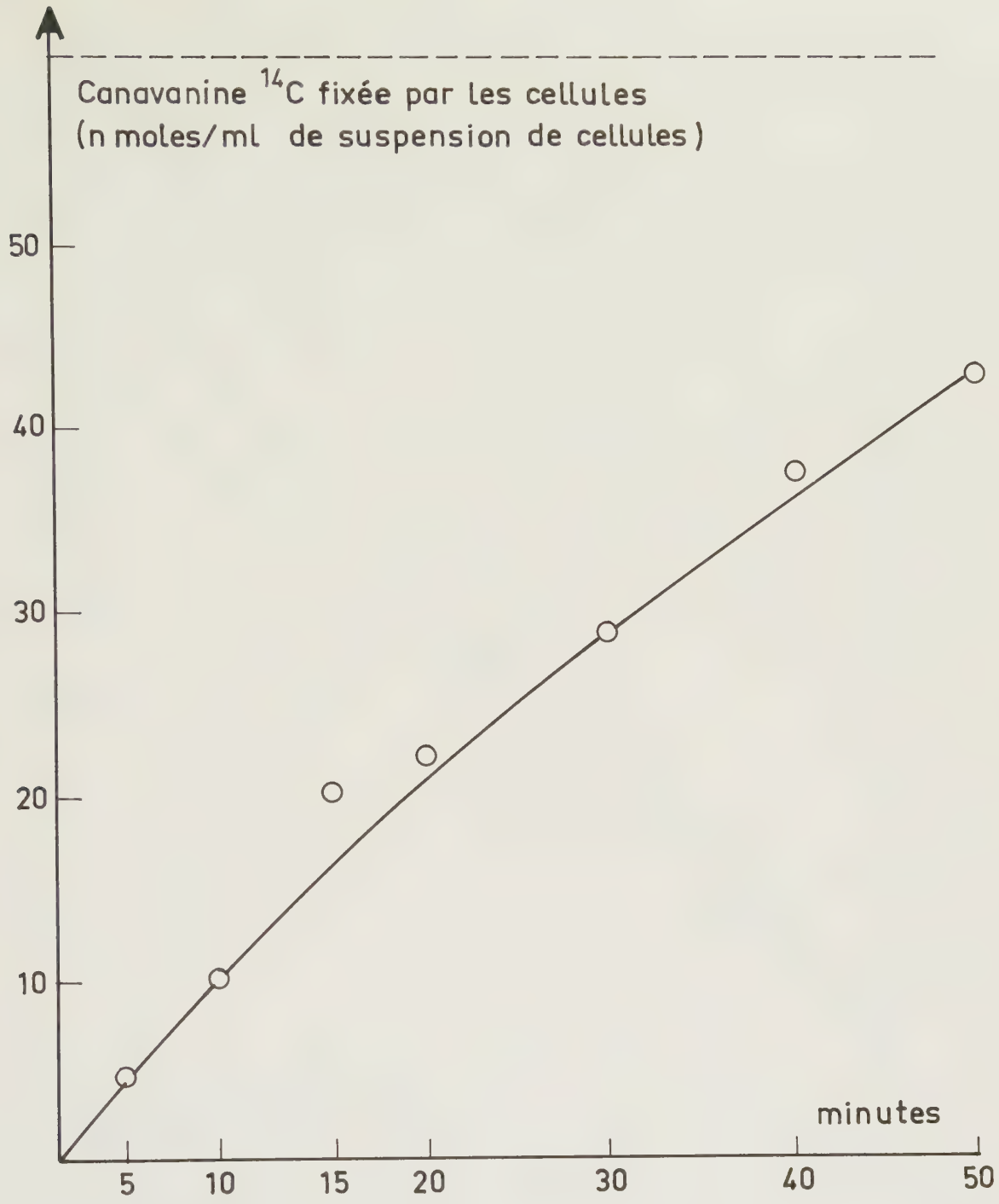


Figure 2 - Pénétration de la canavanine dans les cellules d'hépatome ascitique

Une suspension de cellules (5×10^5 cellules/ml) est incubée à 23°C, en présence de DL-canavanine ^{14}C 3×10^{-5} M (0).

Aux temps indiqués, 1 ml de suspension est prélevé et la quantité d'acide aminé qui a pénétré dans les cellules est mesurée. Le niveau de la ligne en tirets (----) représente la valeur de l'équilibre de concentration en acide aminé entre le milieu d'incubation et les cellules. Le calcul de cette valeur tient compte du volume occupé par les cellules dans 1 ml de suspension.

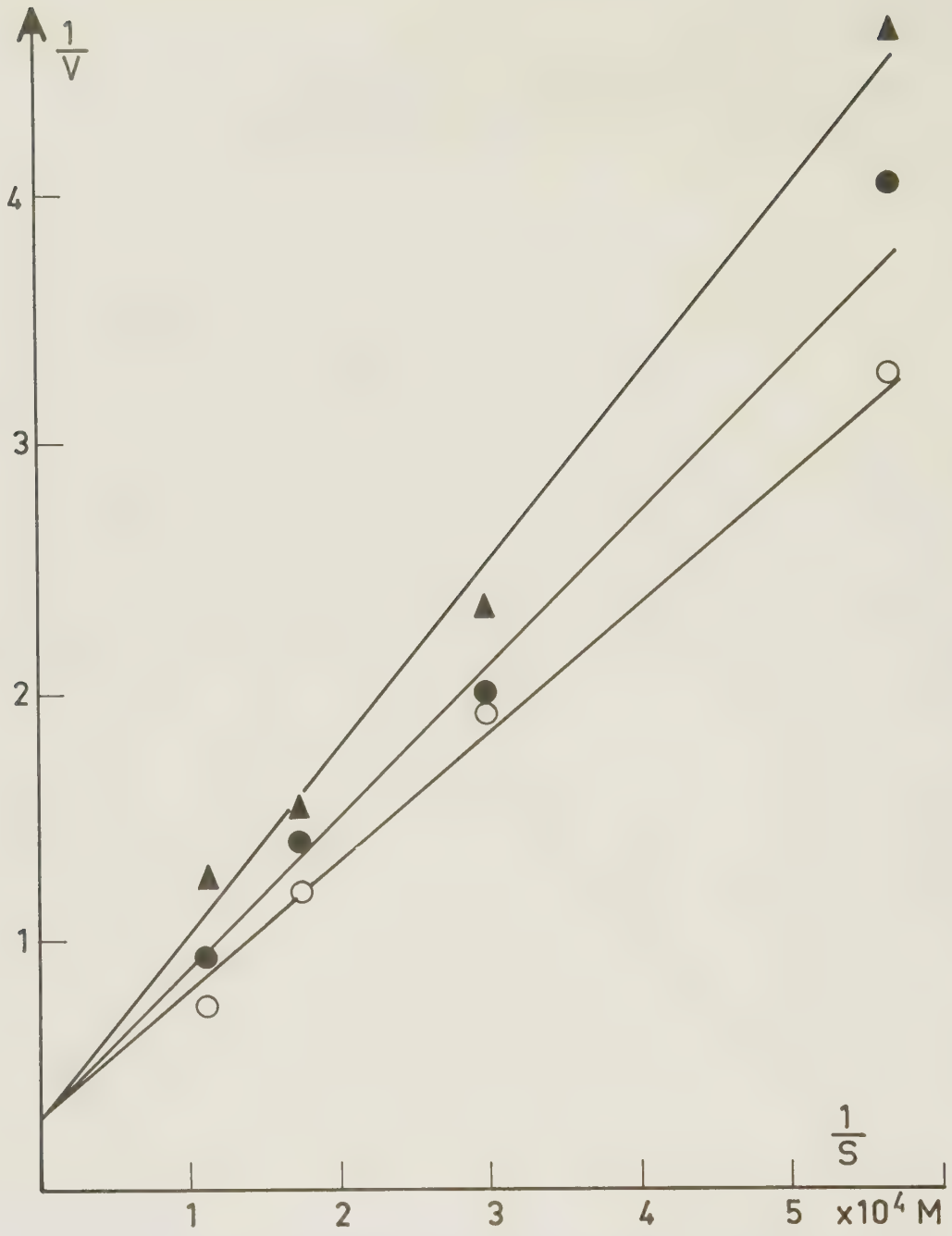


Figure 3 - Inhibition compétitive, par l'arginine, de la pénétration de la canavanine ^{14}C dans les cellules d'hépatome ascitique.

Des suspensions de cellules (8×10^5 cellules/ml) sont incubées à 23°C pendant 10 minutes, en présence de concentrations variables de canavanine ^{14}C : 1,75 ; 3,3 ; 5,7 ; $8,78 \times 10^{-5}$ M, mCi/mM (O) et d'arginine 1×10^{-5} M (●) et 1×10^{-4} M (▲). La quantité de canavanine ^{14}C qui a pénétré dans les cellules est ensuite mesurée.

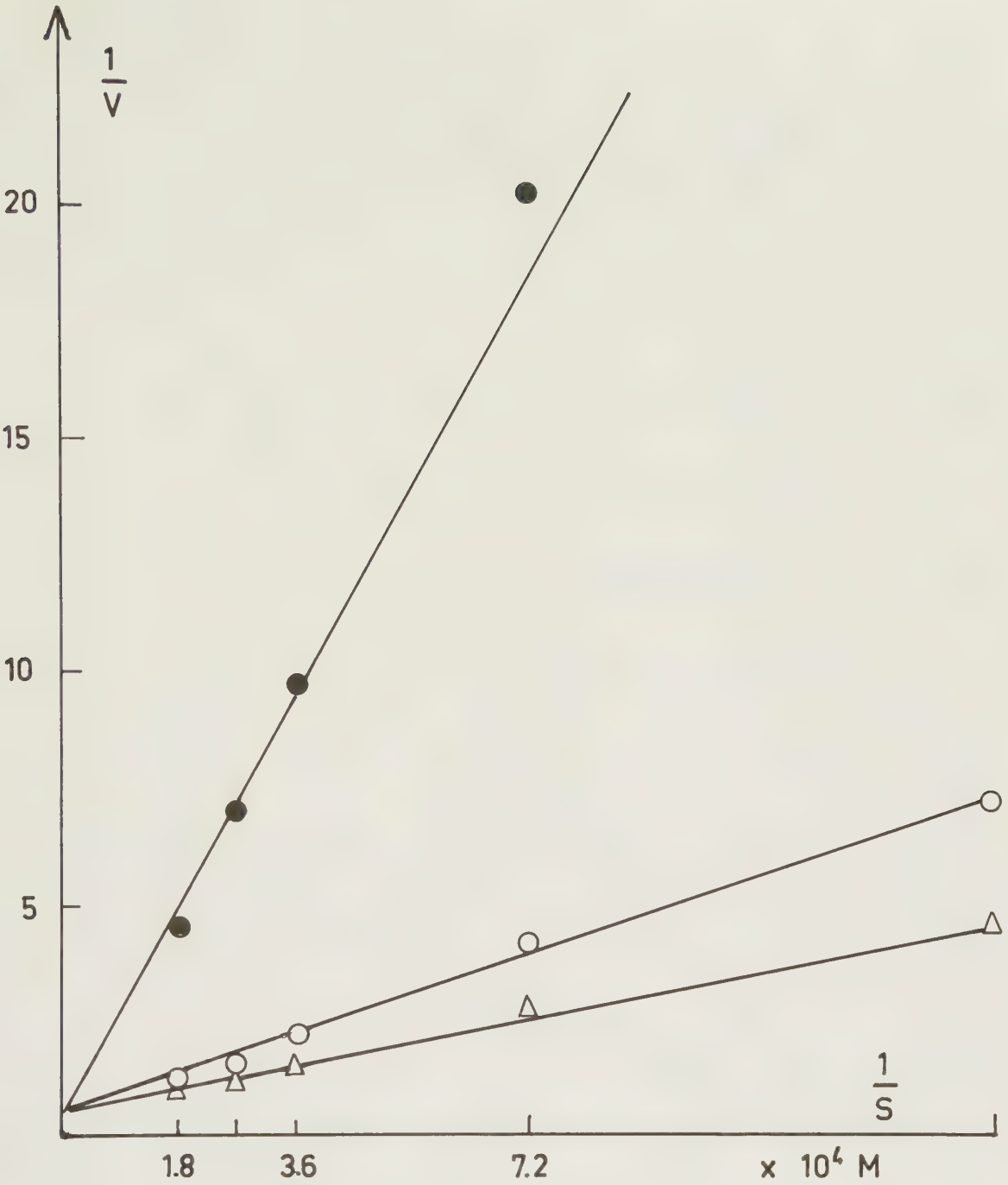


Figure 4 - Inhibition compétitive, par la canavanine, de la pénétration de l'arginine ^{14}C dans les cellules d'hépatome ascitique.

Des suspensions de cellules (8×10^5 cellules/ml) sont incubées à 23°C pendant 10 minutes, en présence de concentrations variables d'arginine ^{14}C : 0,7 ; 1,4 ; 2,8 ; 4,2 et $5,6 \times 10^{-5}$ M, 15 mCi/mM (Δ) et de L-canavanine 1×10^{-3} M (O) et 1×10^{-2} M (●).

La quantité d'arginine ^{14}C qui a pénétré dans les cellules est ensuite mesurée.

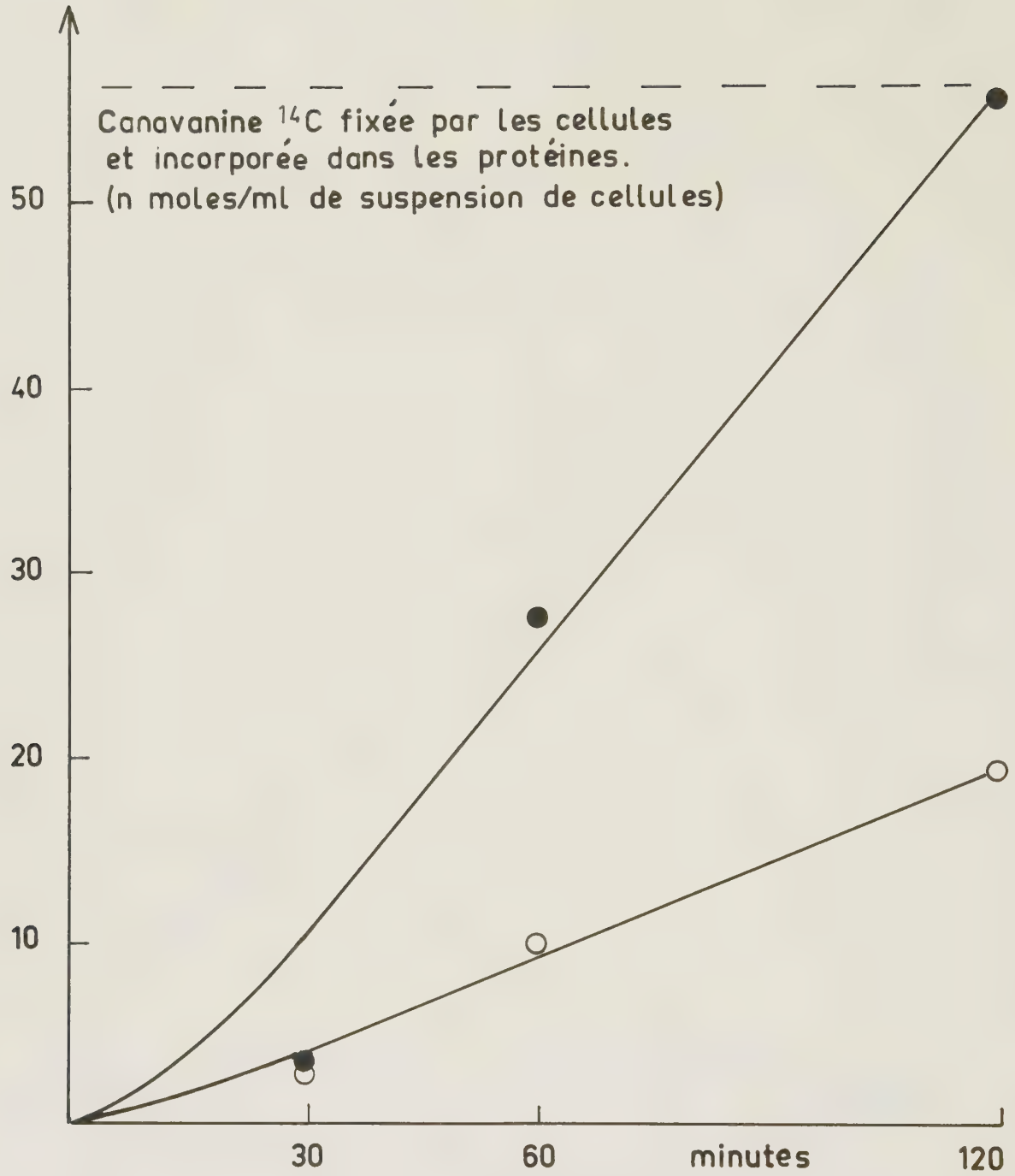


Figure 5 - Pénétration dans les cellules d'hépatome ascitique d'Ehrlich et incorporation dans les protéines de la canavanine ^{14}C.

Une suspension de cellules (8×10^5 cellules/ml) est incubée à 37°C en présence de DL-canavanine ^{14}C $1,5 \times 10^{-5}$ M. Aux temps indiqués sur des fractions aliquotes, on mesure : les quantités de canavanine ^{14}C qui ont pénétré dans les cellules (●) et qui ont été incorporées dans les protéines (O). Le niveau de la ligne en tirets (----) représente la valeur de l'équilibre de concentration en canavanine ^{14}C, entre le milieu d'incubation et les cellules.

2 - Hématies de lapin

L'arginine pénètre très rapidement dans les réticulocytes. Lorsque la concentration en arginine dans ces cellules a dépassé la concentration dans le milieu d'incubation, la vitesse de pénétration diminue, puis devient nulle (figure 6).

Dans les mêmes conditions d'incubation, la quantité de canavanine qui pénètre dans les réticulocytes est très faible : après 10 minutes, elle est d'environ 12 fois inférieure à celle de l'arginine. Une concentration d'équilibre n'est pas encore atteinte en 120 minutes.

L'ensemble de ces résultats montre que les réticulocytes et les hématies (figures 6 et 7) sont incapables de concentrer la canavanine.

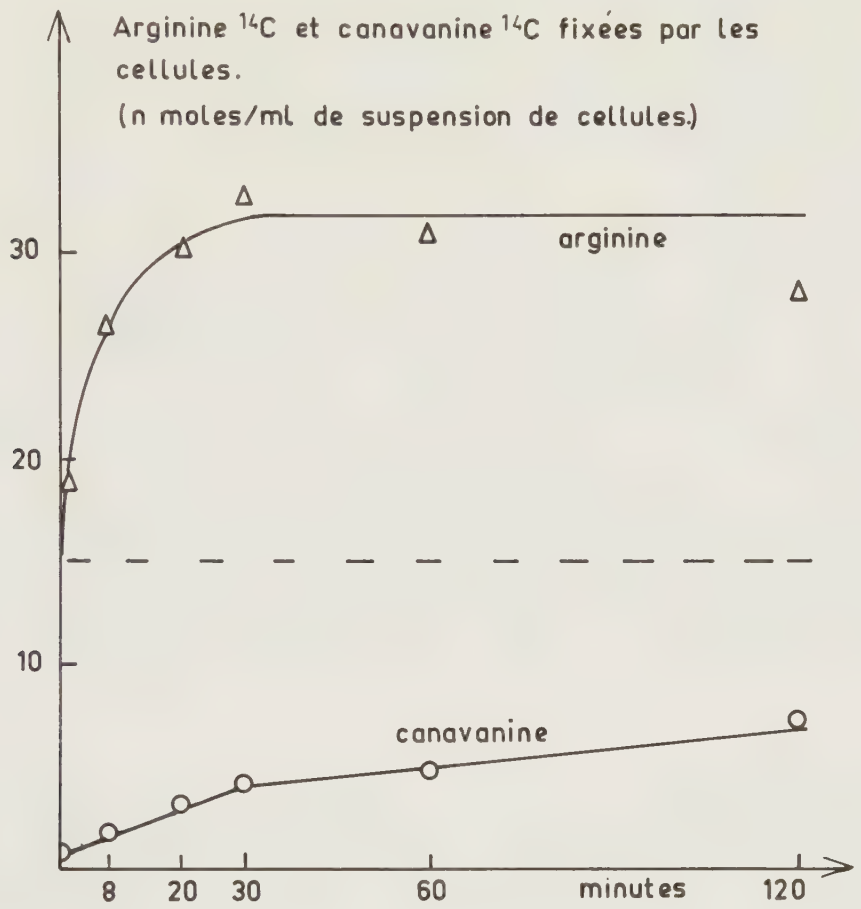


Figure 6 - Pénétration de l'arginine ^{14}C et de la canavanine ^{14}C dans les réticulocytes de lapin.

Aux suspensions cellulaires maintenues à 20°C est ajoutée de la L-arginine ^{14}C $1,5 \times 10^{-5}$ M (Δ) ou de la DL-canavanine ^{14}C 3×10^{-5} M (O). Aux temps indiqués, sur une fraction aliquote, on mesure la quantité d'acide aminé qui a pénétré dans les cellules.

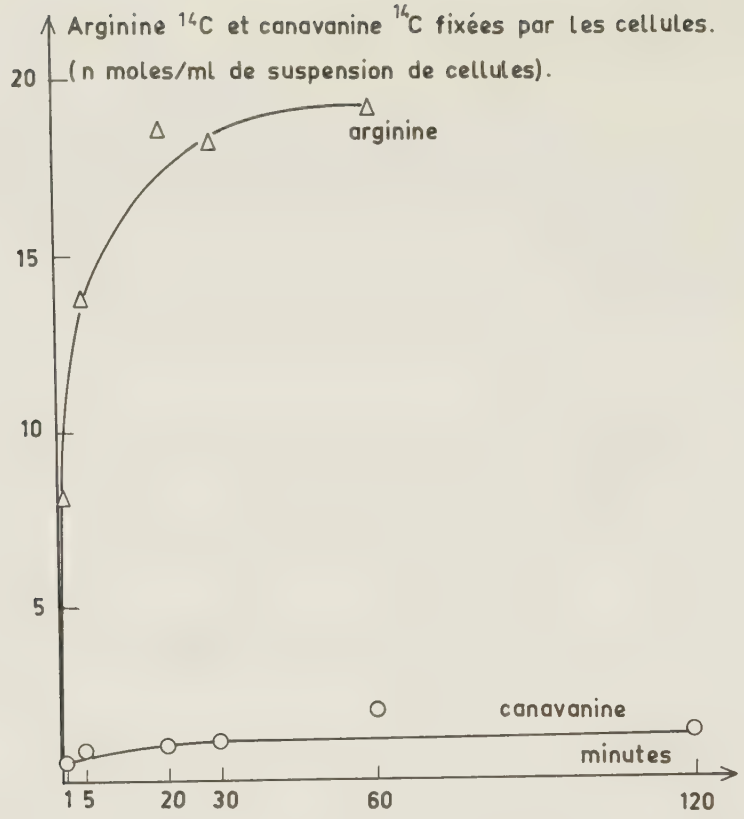


Figure 7 - Pénétration de l'arginine ^{14}C et de la canavanine ^{14}C dans les hématies de lapin.

Aux suspensions cellulaires maintenues à 20°C, est ajoutée de la L-arginine ^{14}C $1,5 \times 10^{-5}$ M (Δ) ou de la DL-canavanine ^{14}C 3×10^{-5} M (O). Aux temps indiqués, sur une fraction aliquote, on mesure la quantité d'acide aminé qui a pénétré dans les cellules.

3 - Cellules bactériennes

La souche bactérienne utilisée (E.coli) est incapable de synthétiser l'arginine. On doit donc s'attendre à obtenir avec ces cellules, une fixation importante de l'arginine exogène. C'est effectivement ce que montrent les résultats portés sur la figure 8.

Des cellules ont été incubées dans des milieux renfermant de l'arginine aux concentrations de 3.10^{-6} et $1,5.10^{-5}$ M. Dans les deux cas, après une heure d'incubation, les cellules ont fixé 20 à 25 % de l'arginine exogène. Ce niveau de fixation est atteint après seulement 15 minutes avec la souche incubée dans le milieu renfermant 3.10^{-6} M d'arginine.

La pénétration de la canavanine est relativement rapide. Elle est seulement environ 2 fois plus lente que celle de l'arginine.

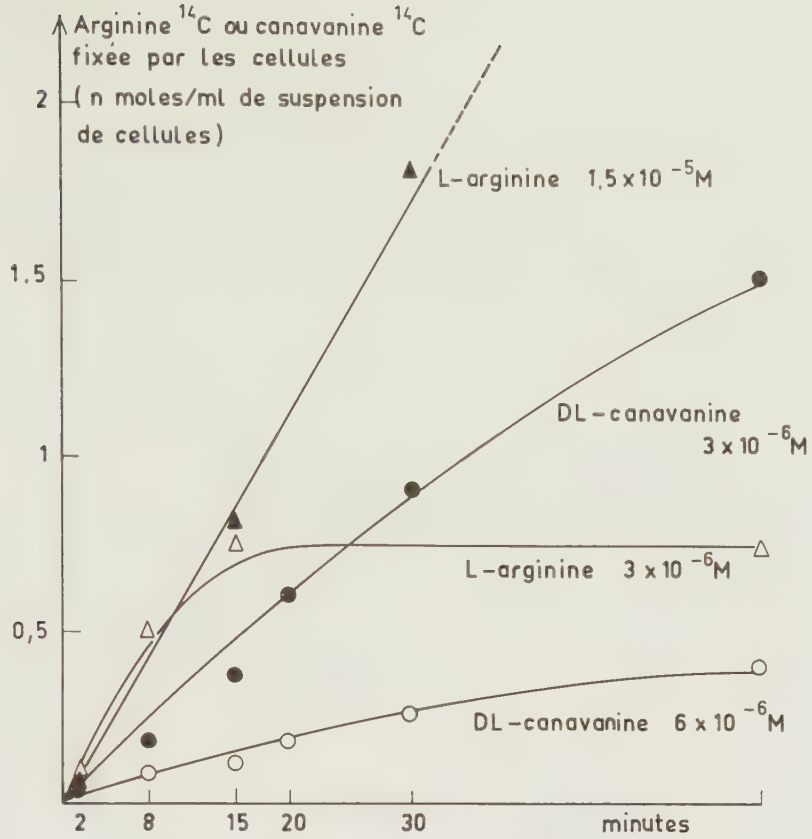


Figure 8 - Pénétration de l'arginine ^{14}C et de la canavanine ^{14}C dans les cellules d'E.coli B arg$^-$.

A des suspensions de bactéries (1×10^8 bactéries/ml) maintenues à 20°C et agitées, on ajoute : de la L-arginine ^{14}C à 3×10^{-6} M (Δ), $1,5 \times 10^{-5}$ M (Δ) ou de la DL-canavanine ^{14}C, 6×10^{-6} M (O), 3×10^{-5} M (●). Aux temps indiqués sur des fractions aliquotes des suspensions, on mesure la quantité d'acide aminé qui a pénétré dans les cellules.

La vitesse de pénétration de la canavanine est à peu près constante pendant les 60 minutes d'incubation. La proportion de canavanine qui a pénétré dans les cellules est, après une heure d'incubation, d'environ 10 % de la quantité de canavanine présente dans le milieu.

Les suspensions de bactéries utilisées présentaient une densité optique à 650 mμ d'environ 0,3. Dans ces conditions, on peut considérer que dans un millilitre de suspension, le volume occupé par les cellules est de un microlitre. (ROBERTS et col, 1963).

Après une heure d'incubation, on a calculé le rapport entre les concentrations en acide aminé contenues dans 1 µl de cellules et 1 µl de milieu. Ce rapport montre que les cellules renferment une concentration en arginine 200 fois plus grande que le milieu. Pour la canavanine, le facteur d'enrichissement est de 100 fois.

Ces résultats montrent que les cellules bactériennes sont capables de réaliser un transport actif de la canavanine. Ce transport est vraisemblablement assuré par le système de perméation de l'arginine.

Incorporation de la canavanine dans les protéines bactériennes

Dans l'expérience dont les résultats sont rapportés figure 9, nous avons suivi la pénétration de la canavanine ^{14}C dans les cellules et simultanément son incorporation dans les protéines. Environ la moitié de la canavanine contenue dans les cellules est incorporée dans les protéines.

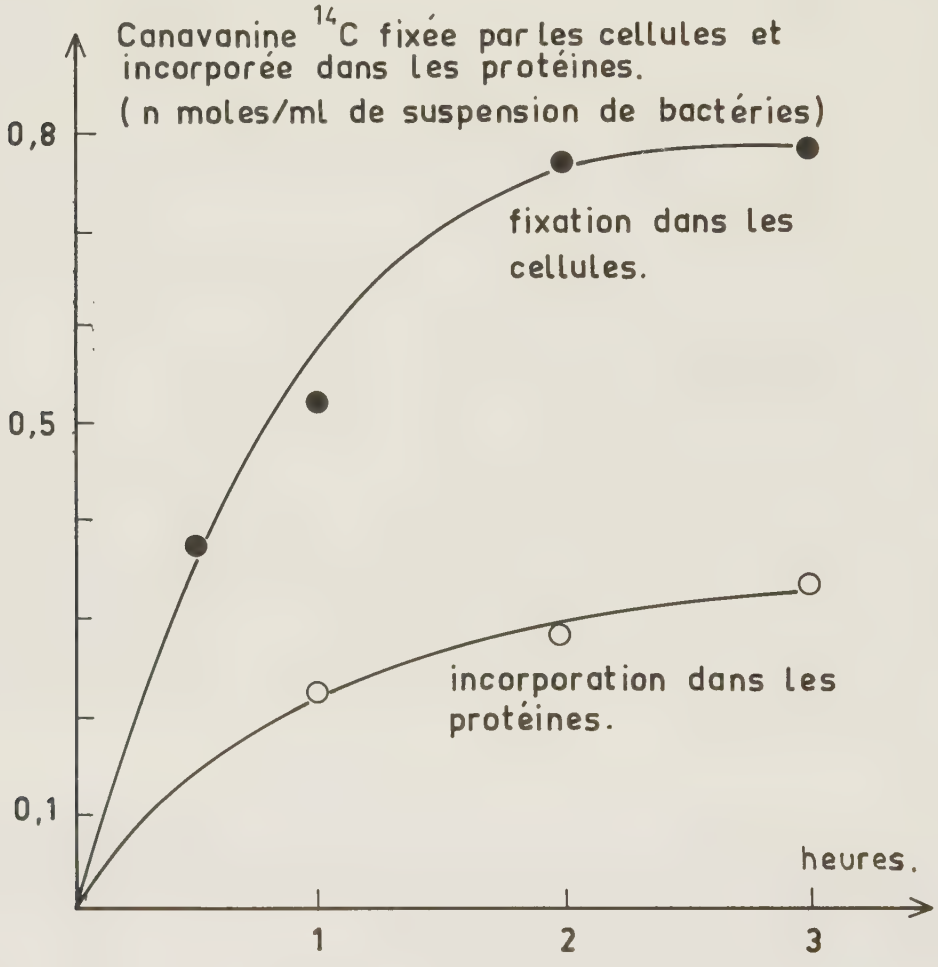


Figure 9 - Pénétration dans les cellules et incorporation dans les protéines d'E.coli B arg$^-$ de la canavanine ^{14}C.

A des suspensions de bactéries (1×10^8 bactéries/ml) maintenues à 20°C et agitées, on ajoute de la DL-canavanine ^{14}C 6×10^{-6} M. Aux temps indiqués, sur des fractions aliquotes, on mesure la quantité de canavanine ^{14}C qui a pénétré dans les cellules (●) et celle qui a été incorporée dans les protéines (O)

DISCUSSION

Les résultats rapportés dans ce chapitre montrent que la canavanine ne peut pas être concentrée dans les hématies et les réticulocytes de lapin, mais l'est dans le cas des cellules d'hépatome ascitique d'Ehrlich et de bactéries.

L'impossibilité, pour les cellules sanguines, de concentrer la canavanine, pourrait être due à l'incapacité des systèmes de perméation de l'arginine de transporter la canavanine à l'intérieur de la cellule. Dans le cas des cellules d'hépatome ascitique d'Ehrlich, la quantité de canavanine qui pénètre dans ces cellules reste inférieure à la concentration dans le milieu extérieur. Cependant, il semble que la canavanine ne pénètre pas par diffusion, mais par un transport actif qui serait assuré par le système de perméation de l'arginine. En effet, le transport de l'arginine est inhibé de façon compétitive par la canavanine et, réciproquement, le transport de la canavanine est, lui aussi, inhibé de façon compétitive par l'arginine.

GRENSON (1966) a également montré que dans le cas de Saccharomyces cerevisae, la pénétration de l'arginine était inhibée compétitivement par la canavanine.

La canavanine qui a pénétré dans les cellules d'hépatome est incorporée dans les chaînes peptidiques par le système enzymatique de synthèse des protéines.

Les cellules bactériennes concentrent très activement la canavanine et ceci à une vitesse seulement deux fois moins grande que celle avec laquelle elles concentrent l'arginine.

L'ensemble des résultats obtenus fait apparaître que le système de perméation pour l'arginine de E.coli possède une bonne affinité pour la canavanine et assure son transport de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. De plus, une proportion importante de la canavanine qui a pénétré dans les cellules d'E.coli est incorporée dans les protéines. Les cellules d'E.coli se montrent, parmi les cellules utilisées, être celles qui conviennent le mieux pour étudier les mécanismes de l'action de la canavanine sur la croissance et la division cellulaire.

IV - ETUDE DE LA SURVIE D'E.coli EN PRESENCE DE CANAVANINE

Ce sont SCHACHTELE et ROGERS (1965) qui ont mis en évidence l'action léthale de la canavanine sur E.coli. Ces auteurs utilisaient des cellules en cours de phase exponentielle d'E.coli W et E.coli K 12 arg$^-$ cultivées en présence d'arginine. Après élimination de l'arginine par lavage, les cellules sont replacées dans du milieu qui renferme de la canavanine, mais pas d'arginine. En fonction du temps d'incubation, le nombre de cellules capables de se diviser et de former une colonie sur milieu gélosé complet est mesuré.

Le nombre de bactéries viables diminue assez lentement pendant 30 à 40 minutes, puis beaucoup plus rapidement ensuite. La deuxième phase de diminution est exponentielle en fonction du temps.

Par une méthode identique, nous avons étudié la perte de viabilité de différentes souches d'E.coli ainsi que les conditions de milieux qui modifient cette perte de viabilité.

Nous avons choisi des souches d'E.coli exigeantes en arginine afin d'éviter toute interférence entre la canavanine et l'arginine synthétisées par les cellules. En effet, si la canavanine répresse la synthèse de l'ornithinetranscarbamylase (MAAS, 1961), enzyme qui fait partie de la chaîne de la synthèse de l'arginine, la canavanine n'a pas d'effet inhibiteur, par feed-back, sur la synthèse de l'arginine (VYAS et MAAS 1963).

METHODES

INCUBATION DES CULTURES

Les souches de bactéries sont conservées sur gélose profonde en tubes scellés et repiquées environ tous les six mois. Avant repiquage, les souches sont isolées sur milieu gélosé. A partir d'une colonie isolée, on ensemence du milieu minéral de Davis complété avec : du glucose 0,4 %, du mélange d'acides aminés (NOVICK et MAAS 1961), de l'arginine : 50 µg/ml et, si les souches l'exigent de la thymine : 5 µg/ml, de l'uracile : 20 µg/ml. Les exigences biochimiques des souches sont contrôlées par des incubations dans des milieux ne renfermant pas le ou les métabolites indispensables aux souches.

Les cultures sont incubées pendant une nuit, au bain-marie à 37° avec agitation. Ces cultures sont appelées "cultures de nuit".

Les cultures de nuit sont repiquées au 1/100 dans le même milieu que ci-dessus et incubées jusqu'à ce que la suspension bactérienne ait atteint une densité

optique, à 650 mμ, d'environ 0,4 (DO 650 mμ = 0,4). Les bactéries sont alors récupérées sur filtre millipore (PHWP 047, pH 0,3 μ) et lavées avec du milieu minéral de Davis dilué au 1/100.

Les bactéries sont ensuite remises en suspension dans du milieu de Davis glucosé (0,4 %) complété suivant les conditions désirées.

La L-canavanine est introduite dans le milieu à raison de 200 μg/ml.

DENOMBREMENT DES CELLULES VIABLES

Les suspensions sont incubées à 37° et à différents temps d'incubation, 0,1 ml de suspension de bactéries est prélevé, dilué dans du milieu de Davis, dilué au 1/100. Un prélèvement de 0,1 ml de suspension diluée est introduit dans 3 ml de gélose molle maintenue en surfusion à 45°C.

La suspension bactérienne est étalée sur du milieu gélosé en boîte de Pétri. Après incubation à 37°, pendant environ 24 heures, le nombre de colonies est compté.

Pour chaque prélèvement, on calcule le quotient : nombre de cellules viables à un temps t, divisé par le nombre de cellules viables au temps t_o. Le logarithme du pourcentage de cellules viables est porté en fonction du temps d'incubation.

RESULTATS

Des bactéries, en phase de croissance exponentielle, exigeantes en arginine (E.coli B arg^-) incubées dans un milieu renfermant 50 μg/ml d'arginine, poursuivent normalement leur division (figure 10) ; par contre cette division est bloquée par une carence en arginine, mais toutes les cellules restent viables.

L'incubation dans un milieu sans arginine, mais renfermant de la canavanine, entraîne une diminution de la viabilité des cellules. Le nombre de cellules viables diminue sensiblement en fonction exponentielle par rapport au temps d'incubation. La pente des courbes de survie est la même pour des concentrations de L-canavanine variant de 50 à 200 μg/ml. Dans les expériences ultérieures, on utilisera en général 200 μg/ml de canavanine.

La sensibilité, vis-à-vis de la canavanine, de différentes souches d'E.coli exigeantes en plusieurs acides aminés, a été déterminée (E.coli CP 79 arg^- his^- leu^- thi^- et E.coli 2 000 f arg^- thr^- leu^- his^-).

Ces souches sont sensibles à la canavanine si elles sont incubées dans un milieu qui renferme tous les acides aminés indispensables, sauf évidemment l'arginine (figure 11). Par contre, la canavanine n'entraîne pas de perte de viabilité si les bactéries sont carencées en un acide aminé indispensable.

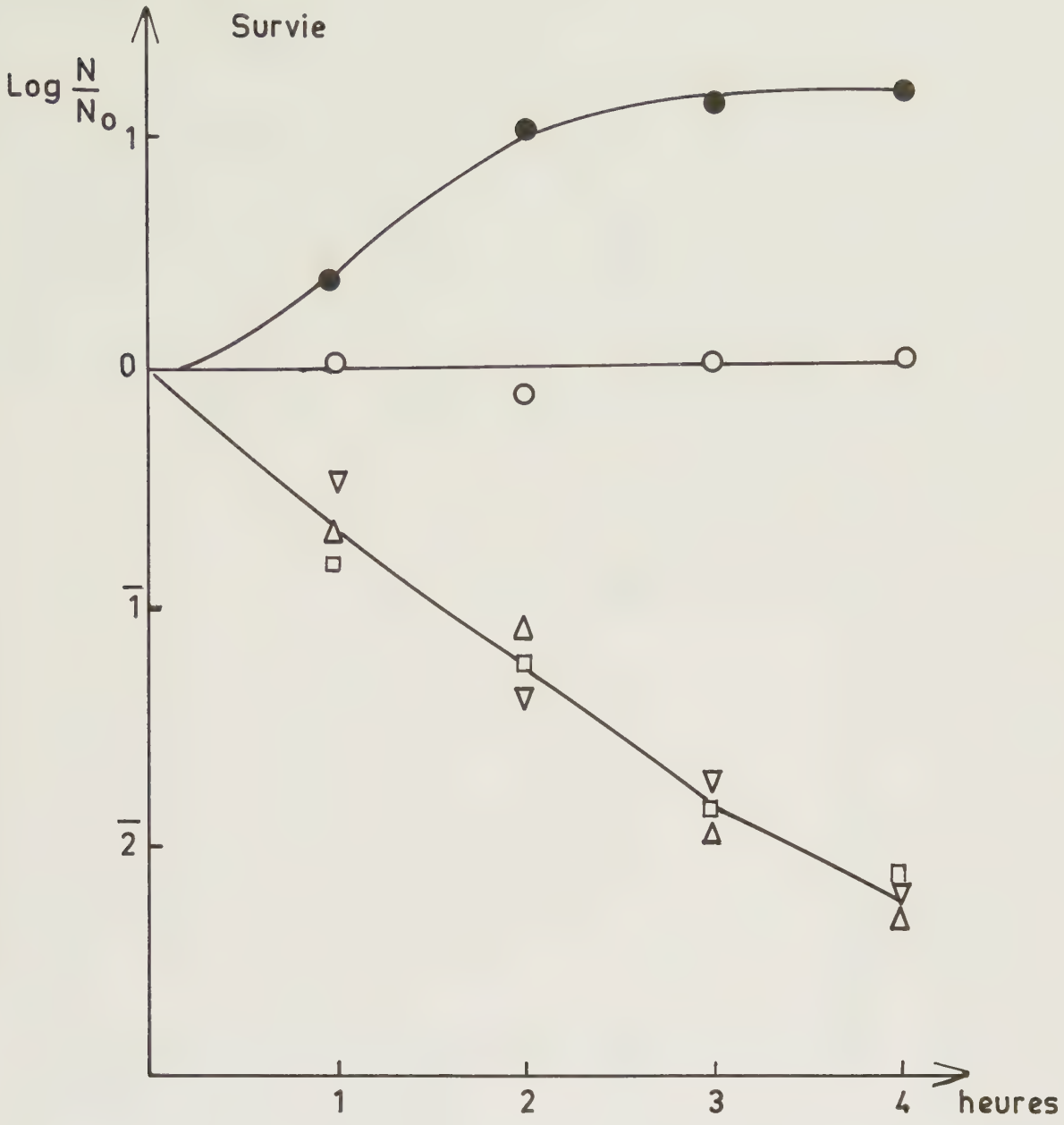


Figure 10 - Survie d'E.coli B arg⁻

Des bactéries en phase de croissance exponentielle sont recueillies et lavées sur filtre Millipore, puis remises en suspension dans un milieu glucosé complet, comme indiqué ci-dessous. Les suspensions sont incubées à 37°C avec agitation et aux temps indiqués, une partie aliquote est prélevée. Le dénombrement des cellules viables est fait par étalement sur un milieu gélosé complet. Le nombre de colonies formées est compté après une nuit d'incubation à 37°C.
(●) arginine 50 µg/ml ; canavanine (Δ) 50 µg/ml ; (▽) 100 µg/ml et (□) 200 µg/ml
(○) sans addition.

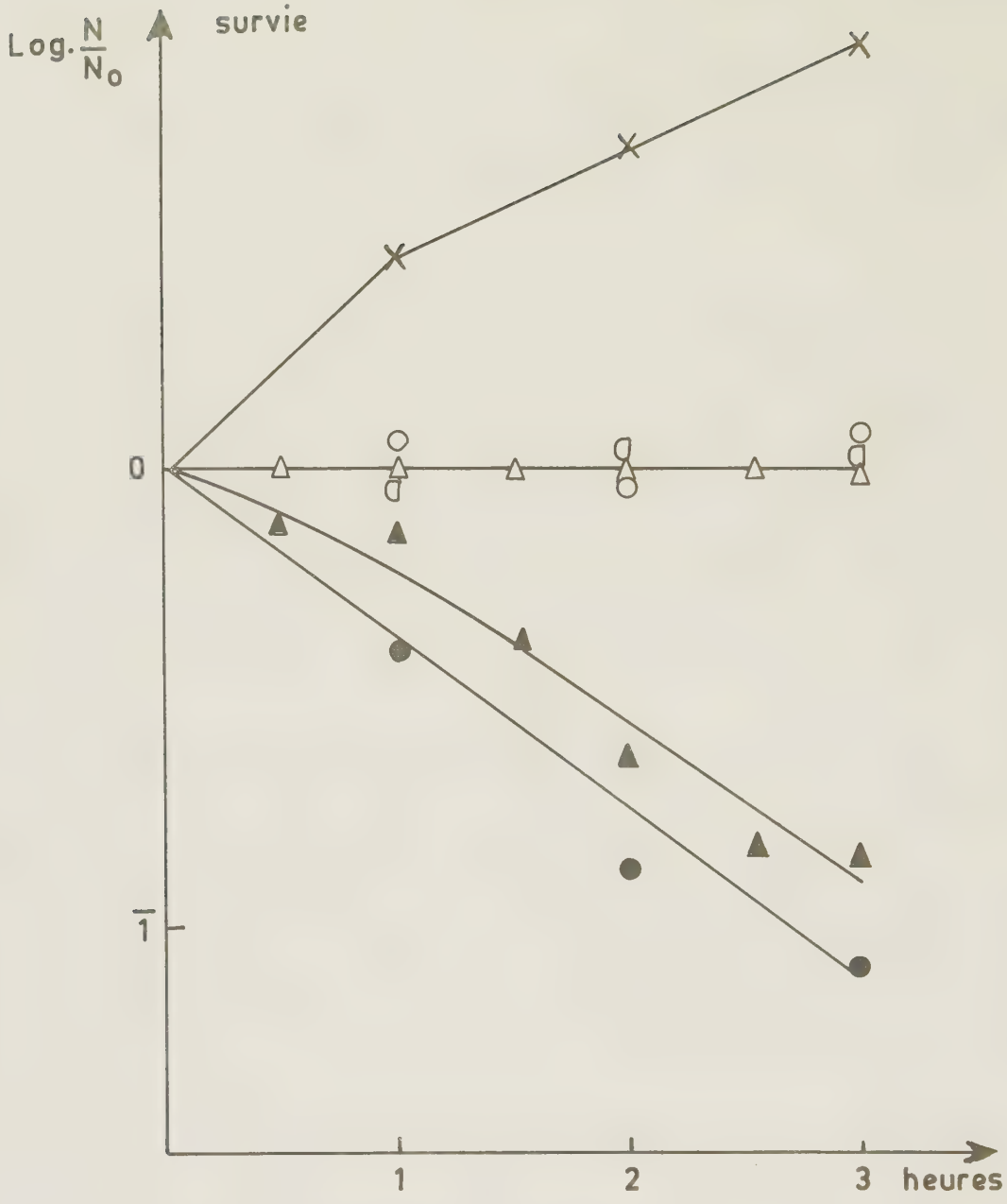


Figure 11 - Survie d'E.coli CP 79 arg⁻ his⁻ leu⁻ thi⁻ et E.coli 2 000 f arg⁻ thr⁻, en présence et en absence de canavanine et d'acides aminés indispensables.

Des bactéries en phase de croissance exponentielle sont recueillies et lavées sur filtre Millipore, puis remises en suspension dans un milieu glucosé complet, comme indiqué ci-dessous. Les suspensions sont incubées à 37°C avec agitation et aux temps indiqués, une partie aliquote est prélevée. Le dénombrement des cellules viables est fait par étalement sur un milieu gélosé complet. Le nombre de colonies formées est compté après une nuit d'incubation à 37°C.

E.coli CP 79 arg⁻ his⁻ leu⁻ thi⁻ : canavanine 200 µg/ml et leucine 50 µg/ml (▲), canavanine 200 µg/ml (sans leucine) (Δ). E.coli 2 000 f arg⁻ thr⁻ : canavanine 200 µg/ml (O), canavanine 200 µg/ml et thréonine 50 µg/ml (●), arginine 40 µg/ml (◘) arginine 50 µg/ml et thréonine 50 µg/ml (×).

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de la figure 12 qui montre qu'un antibiotique, inhibiteur de la synthèse protéique, le chloramphénicol, protège les cellules de la mort par la canavanine.

Si dans les conditions où la synthèse protéique est inhibée par la carence en un acide aminé indispensable ou la présence de chloramphénicol, la canavanine perd son action léthale, on peut penser que celle-ci est due à la formation d'une ou plusieurs protéines anormales, protéines dans laquelle ou lesquelles l'arginine serait remplacée par de la canavanine.

Par contre, on n'explique pas pourquoi une souche de bactéries sensibles à la canavanine, E.coli B arg$^-$, conserve pratiquement toute sa viabilité en présence de canavanine, si elle est incubée dans un milieu non enrichi en acides aminés (figure 13) alors que cette souche se divise normalement dans le milieu sans acide aminé, avec simplement de l'arginine.

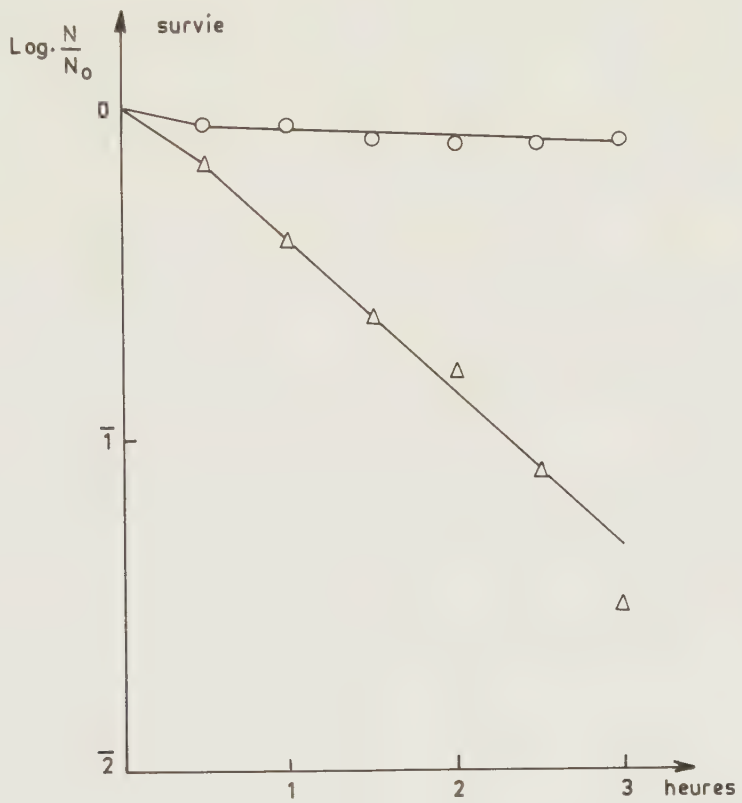


Figure 12 - Survie d'E.coli B arg$^-$ en présence de canavanine et de chloramphénicol.

Des bactéries en phase de croissance exponentielle sont recueillies et lavées sur filtre Millipore, puis remises en suspension dans un milieu glucosé complet, comme indiqué ci-dessous. Les suspensions sont incubées à 37°C avec agitation et aux temps indiqués, une partie aliquote est prélevée. Le dénombrement des cellules viables est fait par étalement sur un milieu gélosé complet. Le nombre de colonies formées est compté après une nuit d'incubation à 37°C.

(O) canavanine 200 µg/ml et chloramphénicol 25 µg/ml, (Δ) canavanine 20 µg/ml.

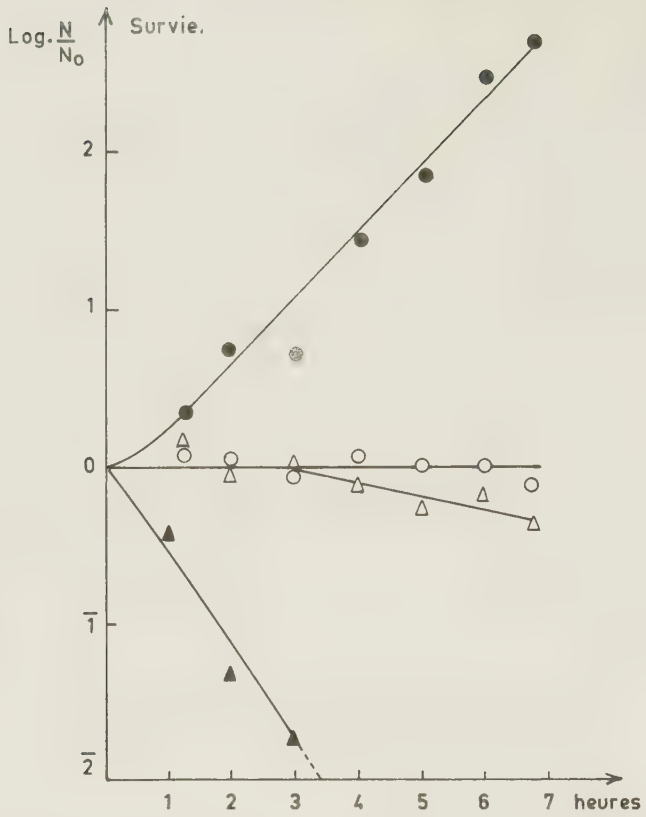


Figure 13 - Survie d'E.coli B arg⁻ en présence de canavanine, dans un milieu enrichi ou non en acides aminés non indispensables.

Des bactéries en phase de croissance exponentielle sont recueillies et lavées sur filtre Millipore, puis remises en suspension dans un milieu glucosé complet, comme indiqué ci-dessous. Les suspensions sont incubées à 37°C avec agitation et aux temps indiqués, une partie aliquote est prélevée. Le dénombrement des cellules viables est fait par étalement sur un milieu gélosé complet. Le nombre de colonies formées est compté après une nuit d'incubation à 37°C.

a) milieu non enrichi en acides aminés non indispensables : arginine 50 µg/ml (●), sans arginine (O),canavanine 200 µg/ml (Δ)

b) milieu enrichi en acides aminés non indispensables, canavanine 200 µg/ml(▲).

Deux souches d'E.coli isogènes : E.coli 15 thy⁻ arg⁻ ura⁻ RC^{str} et E.coli 15 thy⁻ arg⁻ ura⁻ RC^{rel}, incubées dans un milieu renfermant de la thymine, de l'uracile et 200 µg/ml de canavanine ne montrent pas de sensibilité à la canavanine (figure 14). Après 3 heures d'incubation, environ 80 % des bactéries sont encore viables, alors que dans le cas de la souche d'E.coli B arg⁻, dans les mêmes conditions, la survie n'est plus que de 0,6 %. La résistance de ces souches nous avait été signalée par le Dr. RASMUSSEN. On ignore les raisons pour lesquelles ces deux souches sont résistantes à la canavanine.

Des mesures de l'incorporation de la canavanine dans les protéines n'ont pas permis de mettre en évidence des différences quantitatives avec l'incorporation dans les protéines, des cellules des souches sensibles (tableau 2 page 38).

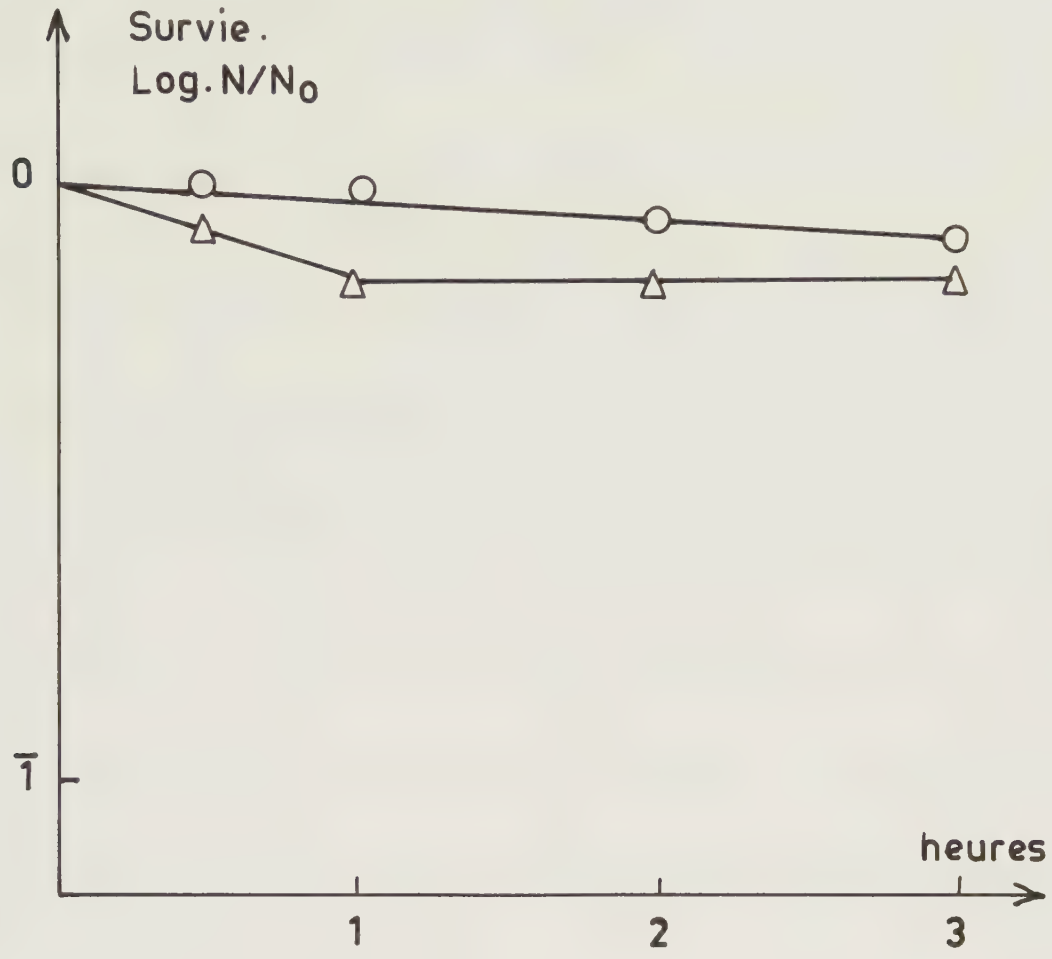


Figure 14 - Survie d'E.coli 15 thy⁻ arg⁻ ura⁻ RC^{str}
et E.coli 15 thy⁻ arg⁻ ura⁻ RC^{rel}.

Des bactéries en phase de croissance exponentielle sont recueillies et lavées sur filtre Millipore, puis remises en suspension dans un milieu glucosé complet, avec canavanine, 200 µg/ml, sans arginine. Les suspensions sont incubées à 37°C avec agitation et aux temps indiqués, une partie aliquote est prélevée. Le dénombrement des cellules viables est fait par étalement sur un milieu gélosé complet. Le nombre de colonies formées est compté après une nuit d'incubation à 37°C. (O) : E.coli 15 thy⁻ arg⁻ ura⁻ RC^{str} ; (Δ) : E.coli 15 thy⁻ arg⁻ ura⁻ RC^{rel}.

DISCUSSION

Les souches d'E.coli utilisées, sauf E.coli 15 thy⁻ arg⁻ ura⁻, sont sensibles à la canavanine. Leur viabilité diminue en fonction exponentielle par rapport au temps. Le profil de ces courbes est légèrement différent de celui obtenu par SCHACHTELE et ROGERS (1965) puisque, dans leur expérience, ils obtiennent des courbes sigmoïdes dont l'épaulement s'étend sur 30 à 40 minutes ; d'autre part, les pentes de la partie exponentielle de leurs courbes sont plus grandes que celles que nous avons obtenues.

Ces différences ne doivent pas être considérées comme fondamentales, car elles peuvent simplement provenir de légères différences de conditions expérimentales ou de sensibilités variables des souches utilisées.

Nous avons observé, avec une même souche de bactéries placée dans des conditions expérimentales identiques, des variations de sensibilité à la canavanine. D'une expérience à l'autre, les pentes des courbes de survie peuvent varier de 1 à 1,4.

Les expériences qui seront reportées dans les chapitres ultérieurs auront pour but principalement de suivre les synthèses macromoléculaires en présence de canavanine. Ces expériences seront réalisées dans les conditions où il y a ou non perte de viabilité. Des expériences de contrôle seront évidemment faites à l'aide de souches de bactéries résistantes à la canavanine.

V - SYNTHESE PROTEIQUE EN PRESENCE DE CANAVANINE

INTRODUCTION

Les traitements qui inhibent la synthèse protéique : carence en acide aminé indispensable ou présence de chloramphénicol, protègent les bactéries de la mort par la canavanine. Ces observations permettent de penser que l'action léthale de la canavanine n'est pas due à la présence de cet analogue sous forme libre dans la cellule, mais résulte de son incorporation dans les protéines.

RICHMOND (1959) a montré que dans Staphylococcus aureus, la canavanine peut remplacer l'arginine dans les protéines. De même, KRUSE, WHITE, CARTER et Mc COY (1959) ont isolé de la canavanine dans un hydrolysat de protéines de cellules de carcinome de Walker qui avaient été incubées en présence de canavanine.

Avec différentes souches d'E.coli, nous avons observé :

a) une stimulation importante de la synthèse protéique en présence de canavanine,

b) la formation de protéine ^{14}C dans des bactéries incubées en présence de canavanine ^{14}C, la radioactivité contenue dans les protéines étant toujours associée à la canavanine,

c) qu'il n'y a pratiquement pas de différence entre les quantités de canavanine ^{14}C incorporées dans les protéines des souches d'E.coli sensibles à la canavanine et celles résistantes.

MATERIEL ET METHODES

Les cultures de bactéries sont préparées comme indiqué dans le chapitre III page 12.

Dans toutes les expériences biochimiques, un contrôle de la survie des bactéries est effectué.

Après lavage des cultures exponentielles, les cellules sont remises en suspension dans le même milieu que celui où elles se trouvaient initialement, complété avec des acides aminés marqués (DL-canavanine ^{14}C ou leucine ^{14}C).

Au moment de la mise en contact des bactéries avec les acides aminés ^{14}C, et aux temps indiqués, 0,5 ml de suspension de bactéries est prélevé et versé dans 0,5 ml d'acide trichloracétique à 10 %, froid. Après avoir maintenu, pendant 15 à 30 minutes à froid, le précipité est récupéré sur filtre de fibres de verre Whatman GF/C et lavé avec 15 ml d'acide trichloracétique à 5 % froid, puis 5 ml d'éthanol froid. Les filtres sont séchés sous une lampe à rayonnement infrarouge, puis

introduits dans des fioles avec 10 ml de mélange scintillant (toluène : 1 litre PPO : 4 g, diméthyl POPOP 0,1 g). La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillateur liquide.

SEPARATION DES DIFFERENTES FRACTIONS PROTEIQUES

Après incubation en présence de canavanine ^{14}C, les cellules sont centrifugées et lavées dans du tampon de dilution, puis remises en suspension dans un volume de tampon de dilution correspondant à 1/20 du volume initial. Les cellules sont cassées par passage dans une French Press à une pression de 750 bars. Le broyat de cellules est centrifugé à 30 000 x g pendant 15 minutes ; le culot de centrifugation obtenu constitue la fraction "membranaire". Le surnageant est centrifugé à 150 000 x g pendant 2 heures ; la fraction surnageante renferme les protéines solubles. Le culot est resuspendu lentement dans du tampon Tris-HCl 0,0005 M pH 7,5, acétate de magnésium 10^{-2} M, puis ajusté à une concentration finale en sulfate d'ammonium de 60 %. Les ribosomes sont isolés dans le culot de centrifugation à 30 000 x g pendant 10 minutes. Les ribosomes sont suspendus dans du tampon Tris-HCl 0,005 M pH 7,5, acétate de magnésium 10^{-2} M. Une partie aliquote de chaque fraction est précipitée par l'acide trichloracétique. Comme précédemment, les précipités sont lavés et leur radioactivité est mesurée.

ISOLEMENT DE LA CANAVANINE ^{14}C INCORPOREE DANS LES PROTEINES D'*E.coli* B arg^-

Une suspension d'*E.coli* B arg^- est incubée à 37°C avec agitation pendant 3 heures, en présence de canavanine ^{14}C. A 10 ml de suspension, on ajoute 1 ml d'acide trichloracétique à 50 % et on laisse précipiter à froid pendant 30 minutes. Après centrifugation, le précipité est successivement lavé avec 10 ml d'acide trichloracétique à 5 %, de l'éthanol, et de l'éther. Après séchage sous vide, le culot est remis en suspension dans 0,5 ml de solution de pronase à 2 mg/ml à 37°C, pendant une nuit. L'hydrolysat est centrifugé ; le surnageant est d'abord soumis à une chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1 pendant 24 heures dans un solvant composé de butanol-n, pyridine, acide acétique, eau (4:1:1:2). Dans ces conditions, l'arginine et la canavanine migrent avec le même R_F. Ces composés sont élués avec de l'eau distillée, puis déposés au centre d'une électrophorèse en tampon carbonate d'ammonium à 2 %, ajusté à pH 9,1 avec de l'ammoniaque. La migration est faite sous une différence de potentiel de 22 volts/cm pendant 1h 30. (RICHMOND 1959). Dans ces conditions de séparation, la canavanine ne migre pas, tandis que l'arginine se déplace de 9 cm vers la cathode.

La localisation de la radioactivité sur l'électrophorèse est obtenue par autoradiographie.

RESULTATS ET DISCUSSION

Par rapport à une culture carencée en arginine et qui, évidemment, n'incorpore pas d'acide aminé dans ses protéines, la canavanine stimule l'incorporation

de leucine ^{14}C dans les protéines (figure 15).

La quantité de leucine ^{14}C incorporée dans les protéines de bactéries incubées en présence d'arginine, est beaucoup plus grande que celle obtenue en présence de canavanine. Cette grande différence est évidemment due au fait que l'arginine permet une division cellulaire, alors qu'en présence de canavanine, le nombre de cellules ne varie pas. Compte tenu du fait que dans un cas, il y a division cellulaire et dans l'autre pas, on peut exprimer les quantités de leucine ^{14}C incorporée, non plus en fonction d'un volume de suspension de bactéries, mais en fonction du nombre de bactéries totales(viables et non viables).

Les calculs montrent que la quantité de leucine ^{14}C incorporée en moyenne par bactérie incubée en présence de canavanine, représente environ 58 % de celle incorporée dans les bactéries incubées en présence d'arginine. Ce résultat fait apparaître que la stimulation, par la canavanine, de la synthèse protéique, est quantitativement importante.

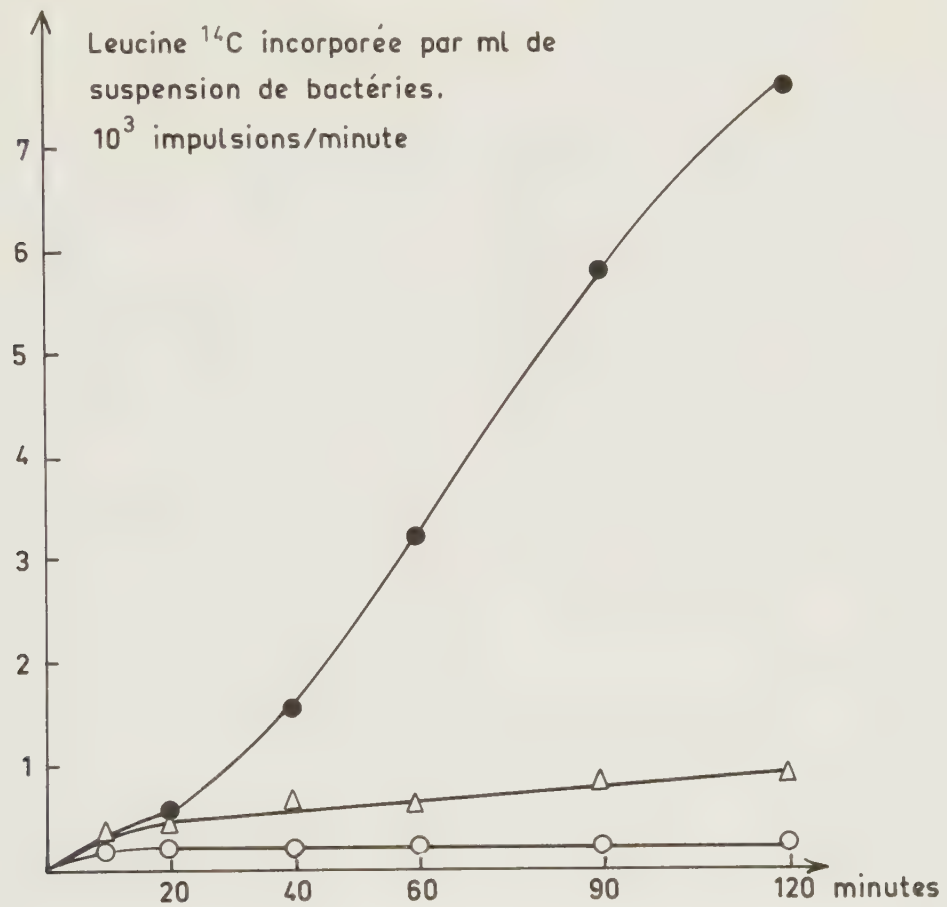


Figure 15 - Stimulation, par la canavanine, de la synthèse protéique d'E.coli B arg$^-$

Des cellules en phase de croissance exponentielle, lavées, sont remises en suspension dans du milieu synthétique glucosé, avec leucine ^{14}C - 50 µg/ml. Aux temps indiqués; la fraction de leucine ^{14}C précipitable par l'acide trichloracétique, est mesurée - arginine 50 µg/ml (O), canavanine 200 µg/ml (Δ), suspension non supplémentée (O).

La stimulation de la synthèse protéique, due à la canavanine, est associée à son incorporation dans les protéines. La stimulation de la synthèse protéique et son incorporation sont inhibées par le chloramphénicol (tableau 1).

Tableau 1

Incorporation de ^{14}C-canavanine et de ^{14}C-leucine dans les protéines d'E.coli B arg^- incubée en présence de canavanine (200 µg/ml) avec ou sans chloramphénicol (CAP).

	CANAVANINE 200 µg/ml	
	Canavanine ^{14}C ipm	Leucine ^{14}C ipm
Témoin	1 158	16 310
CAP	68	1 271

Il était nécessaire de vérifier que la radioactivité retrouvée dans les protéines, à la suite de l'incubation de bactéries avec de la canavanine ^{14}C, était toujours bien associée à cette même molécule car, en effet, la canavanine radioactive utilisée est marquée sur son groupement guanidique par du carbone-14, et une réaction de transguanidination entre la canavanine ^{14}C et l'ornithine conduirait à de l'arginine-[guanido^{14}C] et de la canaline (RATNER et ROCHOUANSKY, 1956). L'arginine-[guanido^{14}C] ainsi formée pourrait alors s'incorporer dans les protéines. Afin de vérifier qu'une telle éventualité peut être exclue dans le cas présent, l'expérience suivante a été réalisée :

Des bactéries ont été incubées dans un milieu renfermant de la canavanine ^{14}C. A partir de ces bactéries, les protéines totales ont été extraites et soumises à une hydrolyse par la pronase. L'arginine et la canavanine ont été séparées l'une de l'autre par une chromatographie suivie d'une électrophorèse. Aucune radioactivité n'a pu être décelée à l'emplacement de l'arginine. Toute la radioactivité était associée à la canavanine.

Ce résultat démontre que la radioactivité retrouvée dans les protéines des bactéries est toujours associée à la canavanine.

A partir des cellules d'E.coli K 12 arg^-, incubées en présence de canavanine ^{14}C, différentes fractions protéiques ont été isolées et, dans chacune d'elles, on a mesuré la quantité de canavanine ^{14}C incorporée. C'est à la fraction protéique membranaire que la majorité de la canavanine est incorporée. On y retrouve en effet 80 % de la radioactivité incorporée. Le reste de la canavanine ^{14}C se retrouve sensiblement pour moitié dans les protéines solubles et les protéines ribosomales (figure 16).

SCHACHTELE, ANDERSON et ROGERS (1968) ont également observé que 80 % de la canavanine ^{14}C incorporée dans les protéines d'E.coli B 90 H sédimente par centrifugation à basse vitesse (6 000 x g).

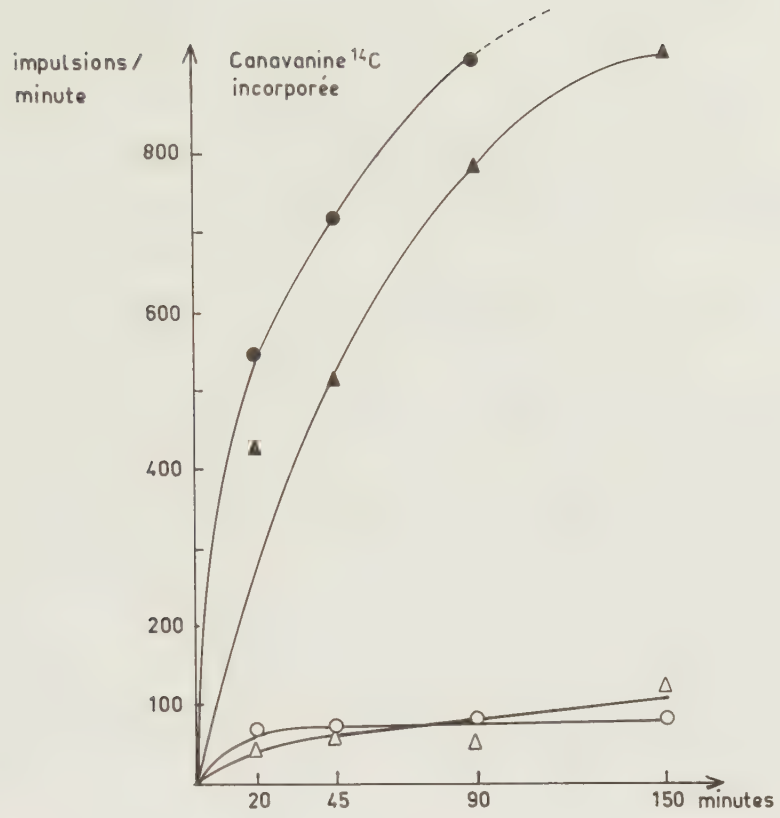


Figure 16 - Répartition de la canavanine ^{14}C dans les différentes fractions protéiques d'E.coli K 12 arg$^-$.

Des cellules en phase de croissance exponentielle, lavées, sont remises en suspension dans du milieu synthétique glucosé, avec canavanine ^{14}C 200 µg/ml (0,1 µCi/ml). Aux temps indiqués, la quantité de canavanine ^{14}C incorporée dans les différentes fractions protéiques est mesurée. Protéines totales : (●), protéines membranaires : (▲), protéines ribosomales : (Δ) et protéines solubles : (O).

La radioactivité spécifique des protéines-canavanine ^{14}C contenues dans ce culot de centrifugation est quatre fois plus grande que celle du surnageant.

Ces auteurs ont montré que les protéines-canavanine ^{14}C qui sédimentent avec les membranes, sont constituées par des organites cellulaires localisés près des membranes. Ces organites ont été observés par microscopie électronique, et isolés. Dans les cellules, les organites se trouvent au nombre de deux à huit. Ils ont une forme sphérique, leur diamètre est variable. Les plus importants peuvent atteindre un diamètre de 0,35 à 0,37 µ.

Il ne semble pas que la perte de viabilité due à la canavanine soit directement liée à la formation de ces organites, car ils ont également été observés dans une souche de bactéries résistantes à la canavanine (E.coli B 90-9).

Il est fort probable que la souche d'E.coli 15 thy$^-$ arg$^-$ ura$^-$ que nous avons utilisée et qui est également résistante à la canavanine (figure 14), présente le même comportement que E.coli B 90-9.

On a vu précédemment (figure 14) que les souches d'E.coli 15 TAU conservent toute leur viabilité lorsqu'elles sont incubées en présence de canavanine. Ces souches incorporent la canavanine dans leurs protéines, et ceci à une vitesse sensiblement identique à celle des souches sensibles, tableau 2.

Tableau 2

Incorporation de canavanine ^{14}C dans les protéines

	Canavanine ^{14}C incorporée par ml de suspension de bactéries	
	E.coli B arg^-	E.coli 15 TAU
30 minutes	200 ng	180 ng
60 minutes	354 ng	320 ng

Des suspensions de bactéries titrant 1×10^8 bactéries/ml sont incubées en présence de canavanine ^{14}C 200 µg/ml (0,1 µCi/ml). Aux temps indiqués la quantité de canavanine ^{14}C incorporée dans les protéines est mesurée.

VI - ACTION DE LA CANAVANINE SUR LA REGULATION DE LA SYNTHESE DE L'ARN

Nous examinerons, dans ce chapitre, l'action de la canavanine sur la régulation de la synthèse de l'ARN.

Chez Escherichia coli, le système de régulation de la synthèse de l'ARN est contrôlé par le gène RC qui, dans les souches sauvages, est sous la forme allélique RC "stringent" (RC^{str}). Dans ces souches RC^{str}, la carence en acide aminé provoque l'arrêt immédiat de la synthèse d'ARN. Par contre, dans les souches mutantes RC "relax" (RC^{rel}), soumises à la même carence, la synthèse d'ARN se poursuit (BOREK et col. 1955).

GALLANT et CASHEL (1967) et CASHEL et GALLANT (1968) ont montré que le système de contrôle RC intervient dans la synthèse des nucléosides triphosphates. Dans les souches RC^{str}, la carence en acide aminé provoque l'arrêt de la synthèse des triphosphates et comme conséquence, celui de l'ARN.

L'effet de la carence sur la synthèse de l'ARN est supprimé par les analogues structuraux d'acides aminés qui sont utilisés par le système aminoacyl-RNA-synthétase et t-RNA correspondant. (FANGMAN et NEIDHARDT, 1964).

Les résultats obtenus concernant l'action de la canavanine sur la synthèse de l'ARN ont été les mêmes avec les souches qui meurent en présence de canavanine E.coli B arg^- ou E.coli K 12 arg^-, et celles qui résistent, E.coli 15 thy^- arg^- ura^-. Nous décrirons ici les données obtenues avec les souches d'E.coli 15 thy^- arg^-ura^- RC^{str} et E.coli thy^- arg^- ura^- RC^{rel}.

Les résultats de ce travail ont montré que :

a) - les bactéries RC^{str} déficientes en arginine et carencées en cet acide aminé synthétisent l'ARN à partir de l'UTP mais pas à partir de l'uracile de l'UMP ou de l'UDP. En présence de la canavanine, ces bactéries utilisent sans distinction ces quatre précurseurs.

b) - Les souches RC^{rel} carencées synthétisent de l'ARN aussi bien à partir de l'UTP qu'à partir de ces trois précurseurs. La canavanine inhibe l'utilisation de l'uracile, l'UMP et de l'UTP, mais pas celle de l'UTP.

METHODES

Les bactéries sont incubées en aérobie à 37°C pendant une nuit dans un milieu minéral préparé selon GALLANT et SUSKIND (1962), complété avec : glucose 0,4 % ; mélange de 17 acides aminés sauf arginine selon NOVICK et MAAS (1961). Si les

souches l'exigent, de la thymine 5 µg/ml, de l'uracile 20 µg/ml et de l'arginine 50 µg/ml sont ajoutés.

Les cultures de 18 heures sont repiquées au 1/50 dans le même milieu et incubées pendant 3 heures. Les cellules sont ensuite récupérées sur filtre Millipore (PHWP 047, pH 0,3 µ), et lavées avec du milieu minéral. Les cellules sont remises en suspension dans le milieu d'incubation convenable soit directement ou après plasmolyse, pour les rendre perméables aux nucléotides.

La plasmolyse a été obtenue dans les conditions décrites par GROS, GALLANT WEISBERG et CASHEL (1967). Après 15 minutes de contact dans une solution de saccharose 2 M, Tris-HCl 0,01 M pH 8 à la température ambiante, les cellules sont lavées avec du tampon Tris 0,01 M pH 8 sur filtre Millipore.

Mesure de l'incorporation d'uracile ^{14}C dans l'ARN

Les cellules lavées sont suspendues dans du milieu complet avec ou sans arginine. Ce milieu contient 20 µg/ml d'uracile ^{14}C (0,01 µCi/ml). La suspension est incubée à 37°C avec aération ; des fractions de 0,5 ml sont prélevées en fonction du temps et versées dans 0,5 ml d'une solution froide d'acide trichloracétique à 10 %. Après 30 minutes à 0°C les précipités sont recueillis sur filtre de fibres de verre Whatman GF/C et lavés avec 10 ml d'acide trichloracétique à 5 % puis avec 5 ml d'éthanol à 95 %. Après séchage des filtres, la radioactivité est mesurée en scintillation liquide en présence de 10 ml d'un mélange de toluène - POPOP-PPO.

Dans tous les cas, au moins 92 % de la radioactivité retrouvée dans le précipité devient acido-soluble après hydrolyse alcaline de l'ARN.

Mesure de l'incorporation des ribonucléotides dans l'ARN

Les cellules plasmolysées, lavées sont suspendues dans du milieu minéral glucosé à 0,4 % et contenant : $MgCl_2$ 0,004 M, ATP, CTP, GTP 0,5 µmole/ml de chaque, UTP^{3}H 0,1 µmole/ml (0,5 µCi). Après incubation à 37°C avec aération, 0,5 ml de suspension est prélevé et versé dans 0,5 ml d'acide trichloracétique à 10 % froid. Après 30 minutes à 0°C, on ajoute 0,5 mg de sérum albumine et centrifuge à froid.

Après dissolution du précipité dans une faible quantité de NaOH 0,2 N, celui-ci est de nouveau recueilli après addition d'acide trichloracétique et centrifigation. Ce traitement qui est fait à 0°C est répété deux fois. Le précipité est finalement dissous dans 0,1 ml d'acide formique et transféré dans des fioles à scintillation liquide contenant 15 ml de mélange : toluène PPO-POPOP et 2,5 ml d'éthanol.

Influence de la canavanine sur la synthèse de l'ARN dans la souche d'E.coli 15 TAU RC^{str}

La synthèse d'ARN a été suivie par l'incorporation d'uracile ^{14}C dans la fraction précipitable par l'acide trichloracétique. Les résultats rapportés dans la figure 17 montrent que E.coli 15 TAU RC^{str} incubé dans un milieu dépourvu d'arginine ne synthétise pas d'ARN, mais dans les mêmes conditions, en présence de canavanine ou de chloramphénicol, cette synthèse a lieu.

Les courbes d'incorporation d'uracile ^{14}C dans l'ARN montrent qu'en présence de canavanine ($7,3.10^{-4}$ M) la quantité d'ARN formé après 40 minutes est d'environ

50 % de celle obtenue en présence de chloramphénicol, alors qu'elle est sensiblement la même après 15 minutes. Lorsque la canavanine est introduite à des concentrations inférieures à $7,3.10^{-4}$ M, (figure 18) le taux de synthèse de l'ARN est diminué : pour une concentration de $0,73.10^{-4}$ M, aucune stimulation n'est obtenue. L'action de l'homoarginine, un autre analogue structural de l'arginine, a été également testée. Ce composé utilisé aux concentrations de : 0,95, 2,85, $9,5.10^{-4}$ M ne stimule pas la synthèse d'ARN (figure 18).

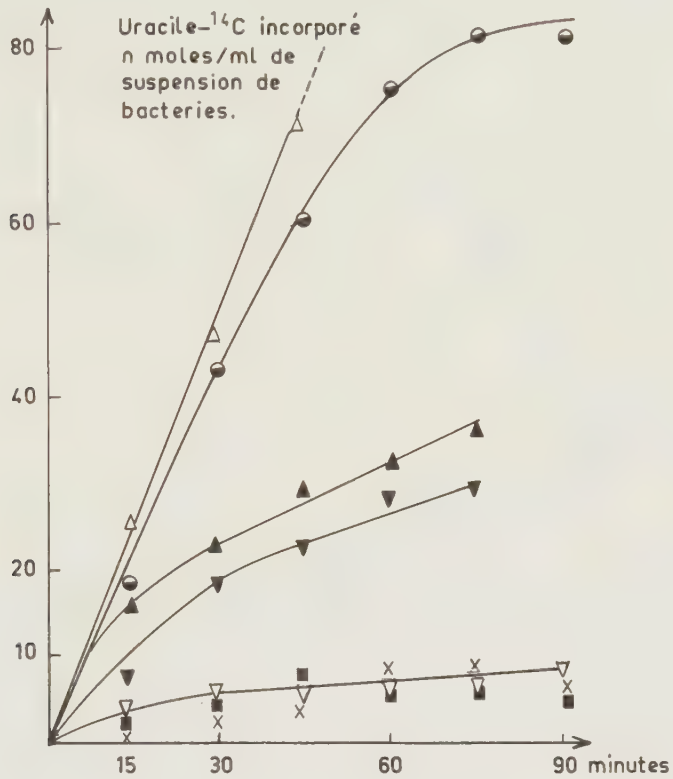


Figure 17 - Incorporation d'uracile ^{14}C dans l'ARN d'E.coli 15 TAU RC^{str}

Après lavage des cultures exponentielles sur filtre Millipore (voir Matériels et Méthodes), les cellules ont été resuspendues dans un milieu contenant du ^{14}C uracile en présence de : (Δ) arginine, 50 µg/ml ; (□) canavanine, 73 µM ; (▽) canavanine, 219 µM ; (▲) canavanine, 730 µM ; (×) homoarginine, 950 µM ; (●) chloramphénicol, 25 µg/ml ; (▽) témoin sans addition. Des aliquotes ont été prélevées en fonction du temps et la quantité de ^{14}C uracile incorporée dans le RNA a été mesurée après précipitation par l'acide trichloracétique.

Influence de la canavanine sur la synthèse d'ARN dans la souche d'E.coli 15 TAU RC^{rel}

Le caractère "relax" de la souche E.coli 15 TAU, est montré dans la figure 18. En l'absence d'arginine, la synthèse d'ARN se poursuit pendant 2 heures environ. Le chloramphénicol n'a pas d'effet sur cette synthèse.

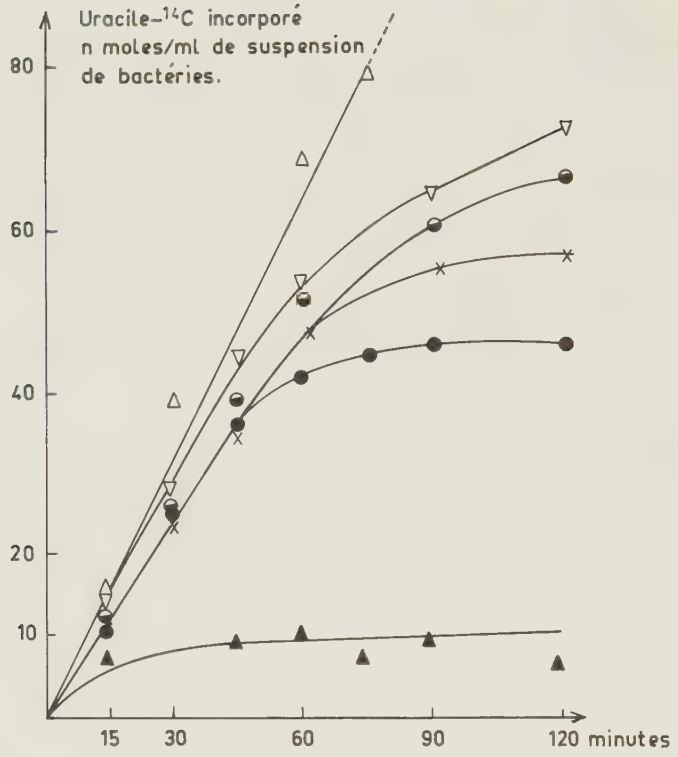


Figure 18 - Incorporation d'uracile ^{14}C dans l'ARN d'E.coli 15 TAU RC^{rel}

Après lavage des cultures exponentielles sur filtre Millipore (voir Matériel et Méthodes), les cellules ont été resuspendues dans un milieu contenant du ^{14}C uracile en présence de (Δ) arginine, 50 µg/ml ; (▲) canavanine, 730 µM ; (×) homoarginine, 950 µM ; (◒) chloramphénicol, 25 µg/ml ; (●) canavanine, 73 µM et chloramphénicol, 25 µg/ml ; (▽) témoin sans addition. Des aliquotes ont été prélevées en fonction du temps et la quantité de ^{14}C uracile incorporée dans le RNA a été mesurée après précipitation par l'acide trichloracétique.

La canavanine introduite dans la suspension bactérienne à la concentration de $7{,}3.10^{-4}$ M, réduit dès le début de l'incubation la synthèse de l'ARN et après une heure, l'incorporation d'uracile ^{14}C est presque complètement arrêtée (figure 18). Cette inhibition peut être levée par le chloramphénicol ; en effet, si le milieu contient à la fois de la canavanine et du chloramphénicol (25 µg/ml), l'inhibition de la synthèse de l'ARN par la canavanine n'a pas lieu. Le taux de synthèse observé dans ce cas est pendant au moins 45 minutes, voisin de celui obtenu dans la culture témoin carencée en arginine. L'homoarginine qui, nous l'avons vu, ne produit pas de relâchement de la synthèse de l'ARN dans la culture stringente, ne modifie pas non plus la synthèse de l'ARN dans la souche "relax" (figure 18).

L'inhibition de la synthèse produite par la canavanine est réversible. En effet, si après un temps de contact de 60 ou de 90 minutes avec la canavanine, alors que la synthèse est complètement stoppée, du chloramphénicol est ajouté, sans

lavage des cellules, la synthèse reprend immédiatement (figure 19).

Les expériences qui viennent d'être décrites ont également été réalisées avec les souches E.coli B arg$^-$ RC^{str} et E.coli K 12 arg$^-$ RC^{rel}. Les résultats obtenus ont été identiques à ceux décrits avec les deux souches E.coli 15 TAU RC^{str} et RC^{rel}.

Ainsi la canavanine, dans le cas des souches stringentes relâche la synthèse d'ARN, mais par contre dans les souches relaxes, elle inhibe partiellement cette synthèse. Ces effets ne se manifestent que lorsque la canavanine est présente dans le milieu d'incubation. En effet, si après un contact de 30 minutes avec l'analogue, les cellules sont lavées puis réincubées, leur comportement est semblable à celui des cellules qui n'ont pas été traitées par la canavanine (figures 20 et 21).

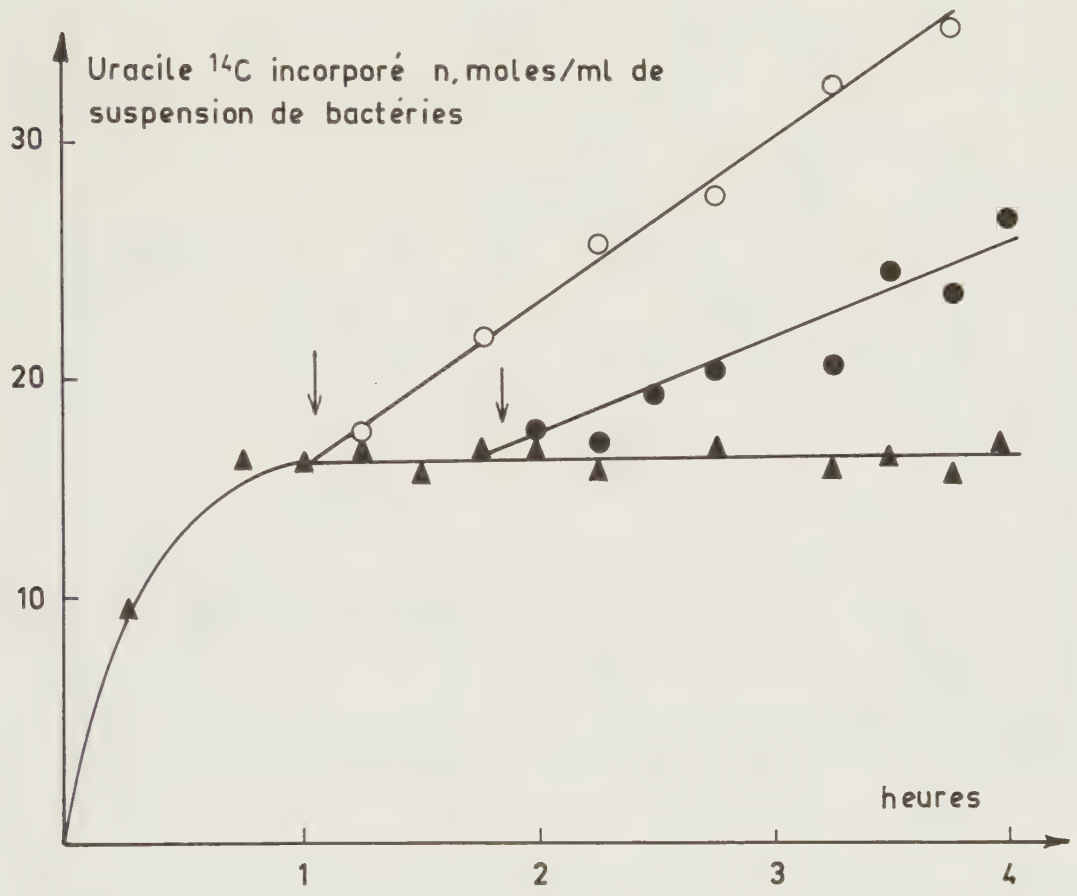


Figure 19 - Suppression par le chloramphénicol, de l'action inhibitrice de la canavanine sur la synthèse de l'ARN.

Une culture exponentielle d'E.coli 15 TAU RC^{rel} lavée, a été remise en suspension dans un milieu sans arginine, avec ^{14}C uracile et canavanine, 730 µM (Δ). Aux temps 60 et 105 minutes, une partie de la culture a été prélevée et additionnée de 25 µg/ml de chloramphénicol (↓). Dans chaque cas, des aliquotes ont été prélevées en fonction du temps pour déterminer la quantité de ^{14}C uracile incorporée.

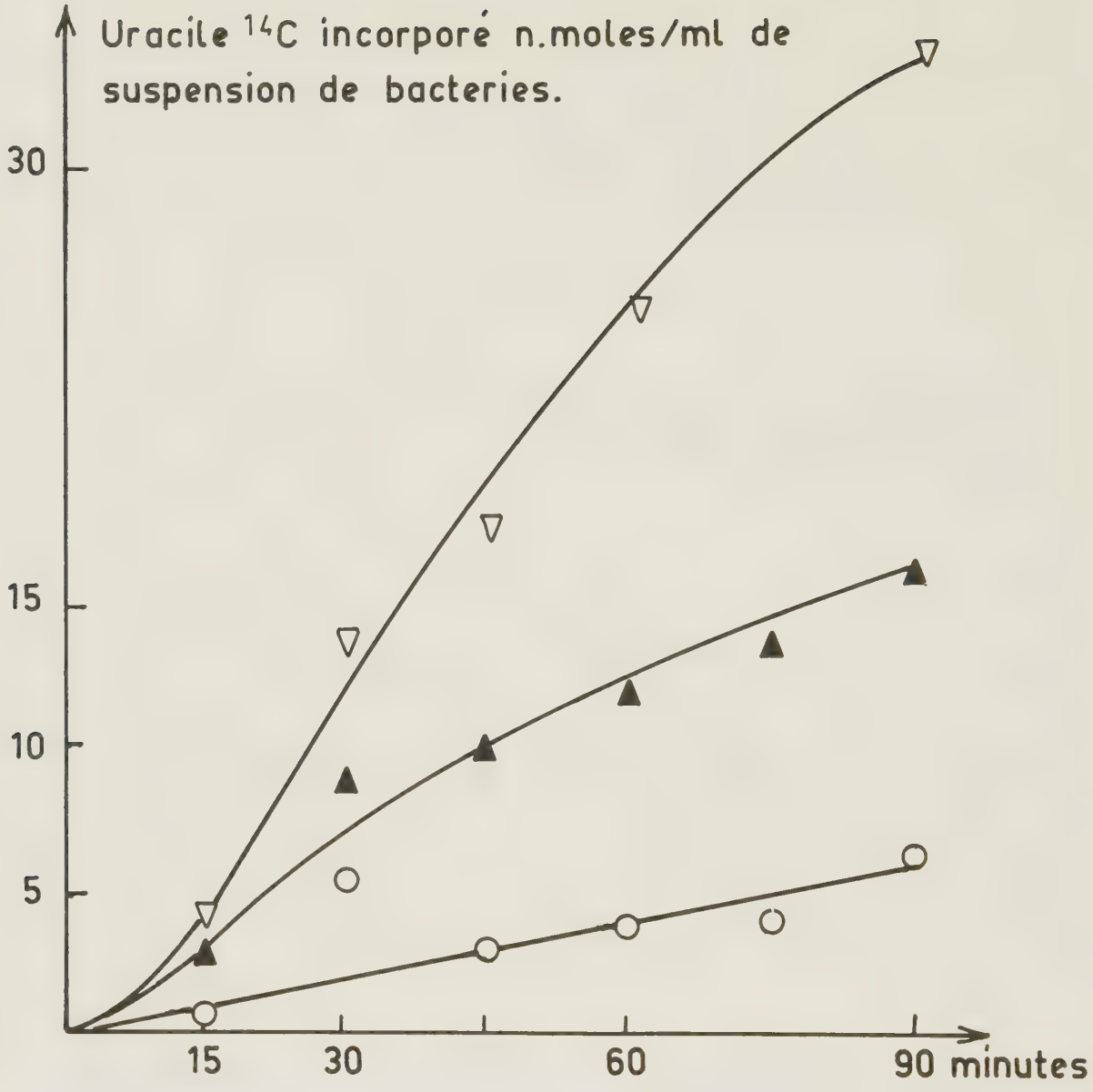


Figure 20 - Synthèse de l'ARN après le traitement par la canavanine.

Des cellules d'E.coli 15 TAU RC^{str} en phase exponentielle ont été lavées puis remises en suspension dans un milieu dépourvu d'arginine et contenant de la canavanine, 730 µM, et incubées pendant 30 minutes. Après ce temps, les cellules ont été lavées de nouveau et réincubées en présence de ^{14}C uracile avec addition de : (Δ) canavanine 730 µM ; (∇) chloramphénicol, 25 µg/ml ; (O) rien.

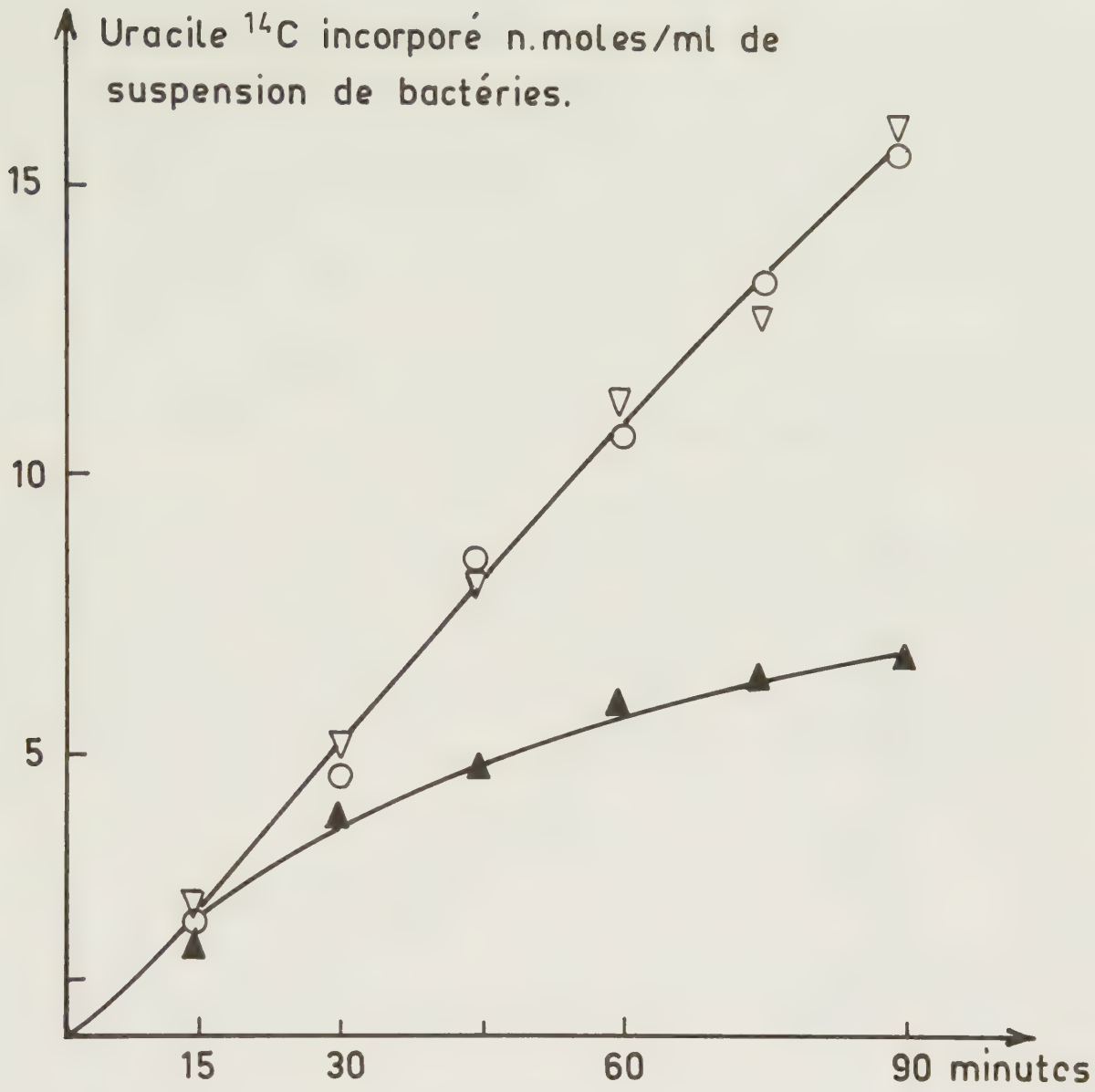


Figure 21 - Synthèse de l'ARN après le traitement par la canavanine.

Des cellules d'E.coli 15 TAU RC^{rel} en phase exponentielle ont été lavées, puis remises en suspension dans un milieu dépourvu d'arginine et contenant de la canavanine 730 µM, et incubées pendant 30 minutes. Après ce temps, les cellules ont été lavées de nouveau et réincubées en présence de ^{14}C uracile avec addition de : (Δ) canavanine, 730 µM ; (∇) chloramphénicol, 25 µg/ml ; (O) rien.

Mesure de la durée de vie de l'ARN formé en présence de canavanine dans les bactéries relaxes

L'uracile ^{14}C est incorporé dans l'ARN des cellules d'E.coli 15 TAU RC^{rel}, durant une carence en arginine ou bien en présence d'arginine ou de canavanine. Les cellules sont ensuite lavées puis incubées dans un milieu dépourvu de glucose. Pendant la carence en glucose, on suit la dégradation de l'ARN ^{14}C préformé. (DALGARNO et GROS, 1968). Les courbes de dégradation montrent que l'ARN ^{14}C formé pendant la carence en arginine et l'ARN ^{14}C formé en présence de canavanine ont sensiblement la même durée de vie (figure 22).

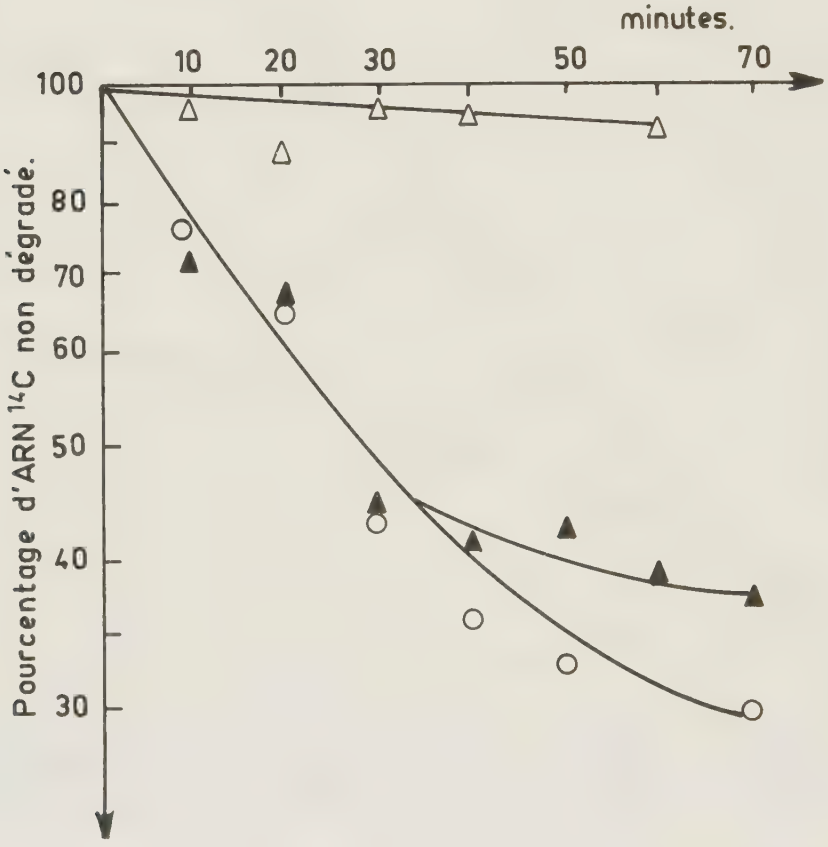


Figure 22 - Dégradation de l'ARN ^{14}C formé dans une culture d'E.coli 15 TAU RC^{rel}

Des cellules en phase de croissance exponentielle ont été lavées puis remises en suspension et incubées pendant 60 minutes en présence d'arginine, 50 µg/ml (Δ), ou de canavanine, 730 µM (▲), dans un milieu de culture contenant du ^{14}C uracile, ou en leur absence (O). Après un nouveau lavage, elles ont été réincubées dans du milieu non radioactif sans glucose et non supplémenté. Des fractions ont été prélevées en fonction du temps et traitées par l'acide trichloracétique.

La diminution de la radioactivité retrouvée dans le précipité reflète la dégradation de l'ARN fermé dans le milieu qui contenait l'uracile ^{14}C.

Incorporation des ribonucléosides mono et diphosphates dans l'ARN d'E.coli 15 TAU RC^{str} et d'E.coli 15 TAU RC^{rel}

Dans les cellules E.coli 15 TAU RC^{str} plamolysées et carencées en arginine, l'incorporation d'UDP dans l'ARN en présence des autres nucléosides diphosphates est stimulée par la canavanine (figure 23). Comme dans le cas de l'incorporation de l'uracile ^{14}C, le relâchement est, pendant 45 minutes, identique à celui obtenu avec le chloramphénicol. L'addition de chloramphénicol et de canavanine conduit à un taux de synthèse voisin de celui obtenu avec le chloramphénicol seul. Le comportement des bactéries relaxes est différent. L'incorporation d'UMP ^{14}C et d'UDP ^{3}H dans ces cellules est inhibée par la canavanine (figures 24 et 25). Cette inhibition de l'incorporation d'UDP ^{3}H dans les bactéries E.coli 15 TAU RC^{rel} est partiellement supprimée par le chloramphénicol.

L'ensemble de ces résultats montre que dans les cellules RC^{rel}, l'utilisation de l'uracile ou des ribonucléosides mono ou diphosphates pour la synthèse de l'ARN est inhibée par la canavanine.

Influence de la canavanine sur l'incorporation d'UTP dans l'ARN

Lorsque l'on fournit à des cellules plasmolysées RC^{str} ou RC^{rel}, comme précurseur de l'ARN, des ribonucléosides triphosphates (UTP ^{3}H + ATP + CTP + GTP), ceux-ci sont incorporés dans l'ARN même lorsque les cellules sont carencées en acide aminé indispensable, (figures26 et 27). L'incorporation de ces précurseurs n'est pas soumise au mécanisme de régulation de la synthèse d'ARN. Dans ces conditions, la présence de canavanine n'entraîne aucune modification de l'incorporation des ribonucléosides triphosphates aussi bien dans les bactéries RC^{str} que RC^{rel}.

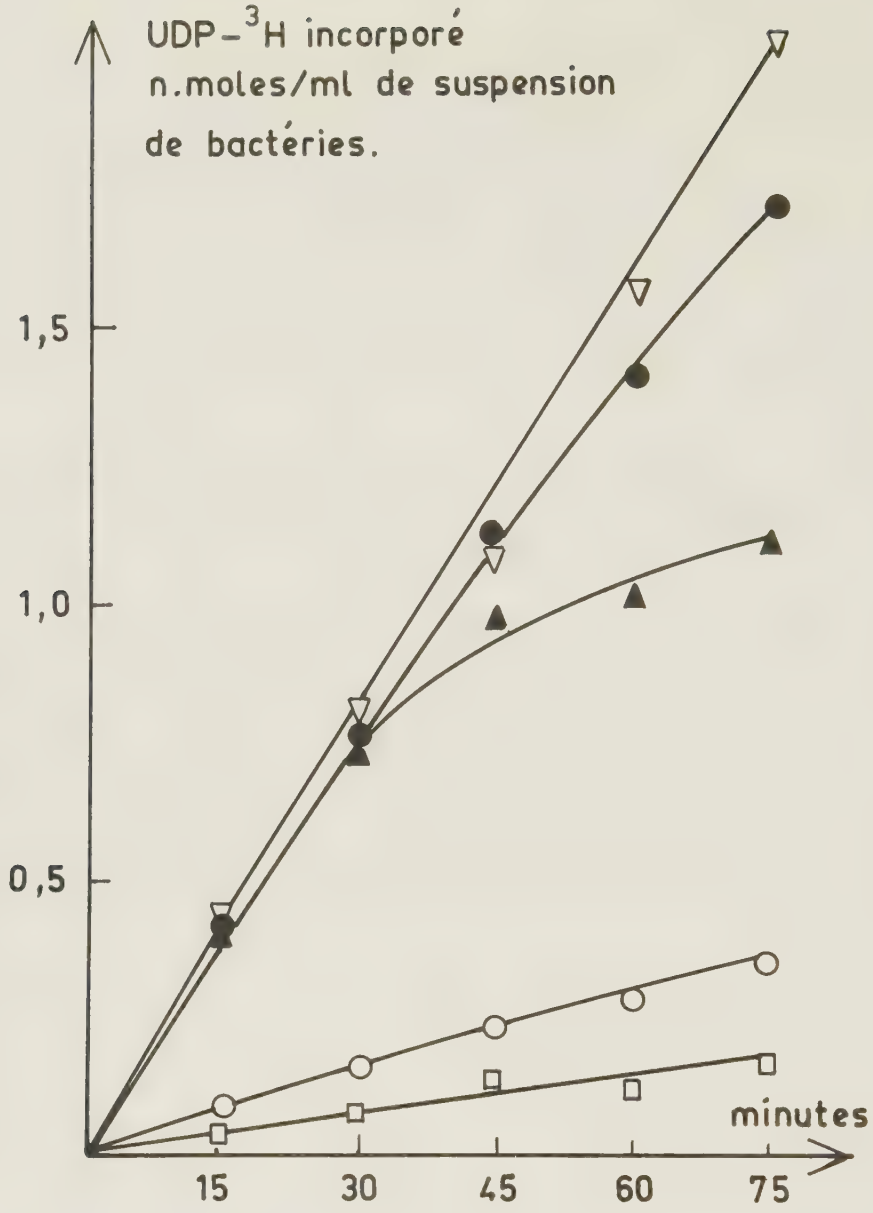


Figure 23 - Incorporation d'UDP ^{3}H dans l'ARN d'E.coli 15 TAU RC^{str}

Des cellules en phase de croissance exponentielle, lavées, ont été plasmolysées (voir Matériel et Méthodes) et remises en suspension dans un milieu de culture renfermant toujours : (O) ADP, GDP, CDP, 0,5 µmole/ml de chaque, et ^{3}H UDP 0,1 µmole/ml (0,5 µCi) ; et en outre : (▽) chloramphénicol, 25 µg/ml ; (▲) canavanine, 730 µM ; (●) canavanine, 730 µM, et chloramphénicol, 25 µg/ml ; (□) actinomycine 125 µg/ml. Les aliquotes ont été prélevées, traitées par l'acide trichloracétique et leur radioactivité, correspondant à l'incorporation de UDP ^{3}H dans l'ARN, a été déterminée. Le résultat obtenu en présence d'actinomycine montre l'efficacité de la plasmolyse qui a permis la pénétration de cet antibiotique dans les cellules et l'arrêt de la synthèse de l'ARN alors que, on le sait, il est sans action sur les cellules non plasmolysées.

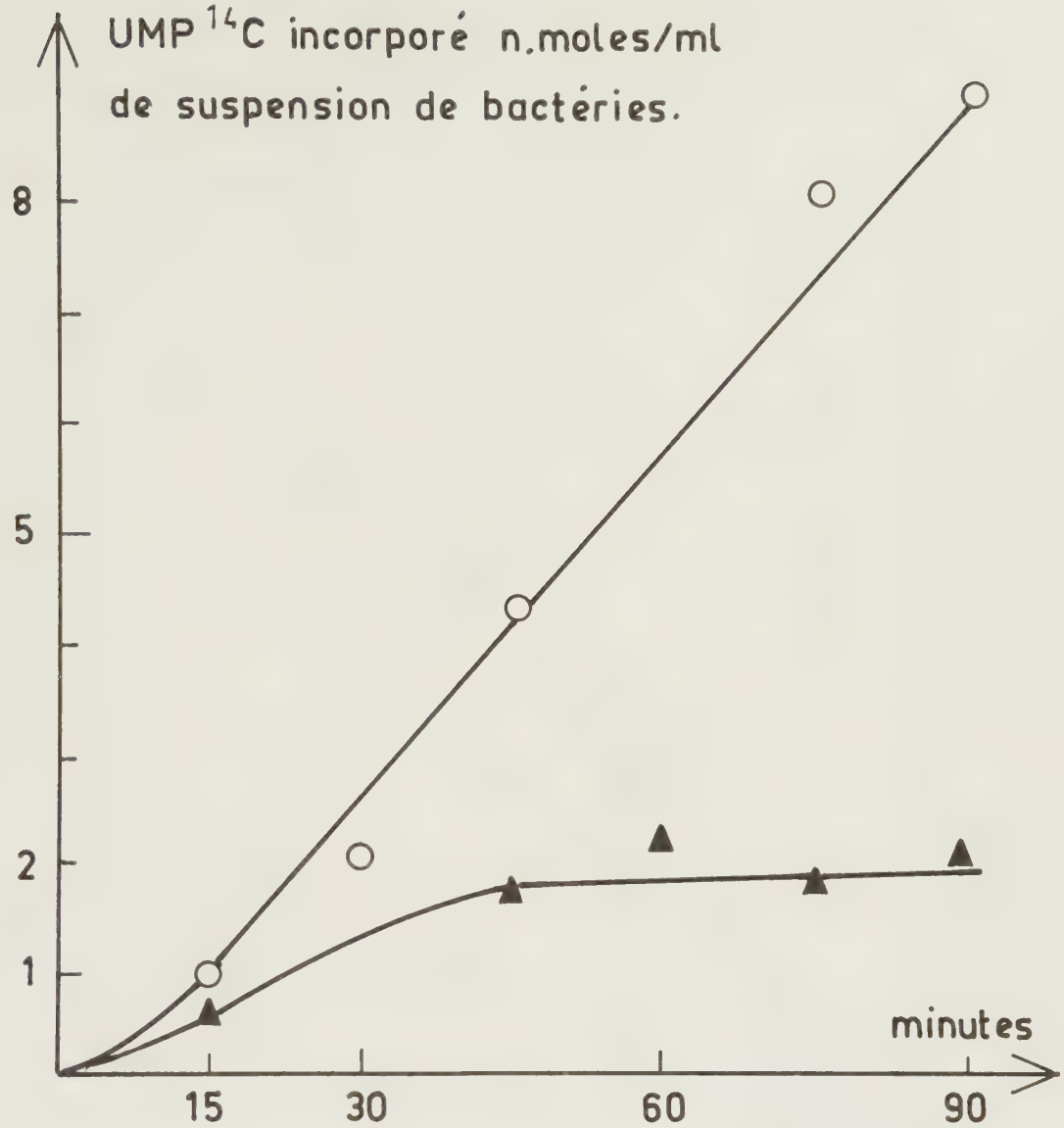


Figure 24 - Incorporation de UMP ^{14}C dans l'ARN d'E.coli 15 TAU RC^{rel}

Les conditions ont été les mêmes que celles décrites dans la figure 23, mais les nucléosides diphosphates ont été remplacés par des nucléosides monophosphates AMP, GMP, CMP, 0,5 µmole/ml de chaque et UMP ^{14}C 0,1 µmole/ml (0,5 µCi). Culture : (O), témoin ; (Δ), avec canavanine, 730 µM.

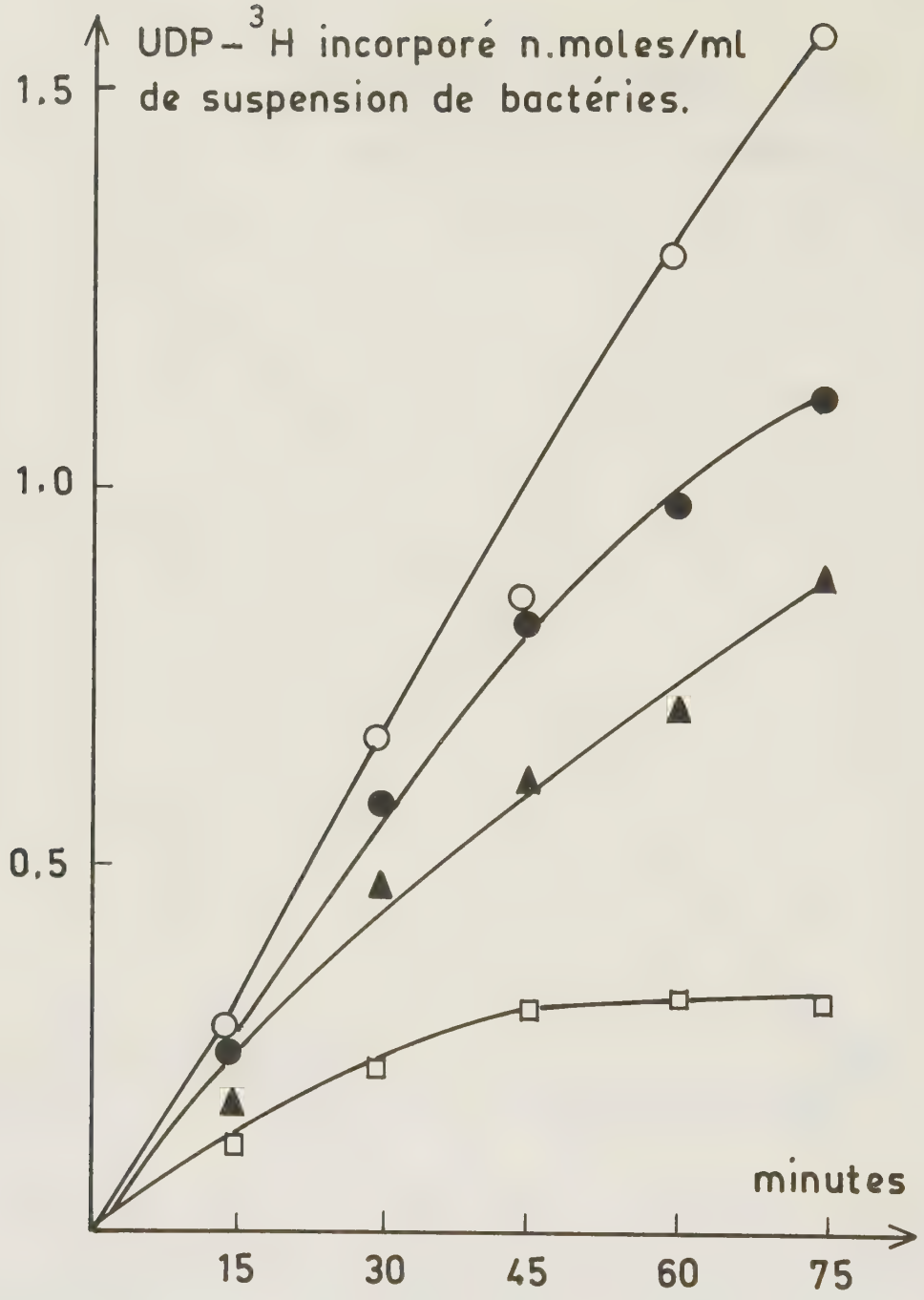


Figure 25 - Incorporation de UDP ^{3}H dans l'ARN d'E.coli 15 TAU RC^{rel}

Les conditions ont été les mêmes que celles décrites dans la figure 23. (O) témoin ; (▲) canavanine, 730 µM ; (O) canavanine, 730 µM, et chloramphénicol 25 µg/ml ; (□) actinomycine, 125 µg/ml.

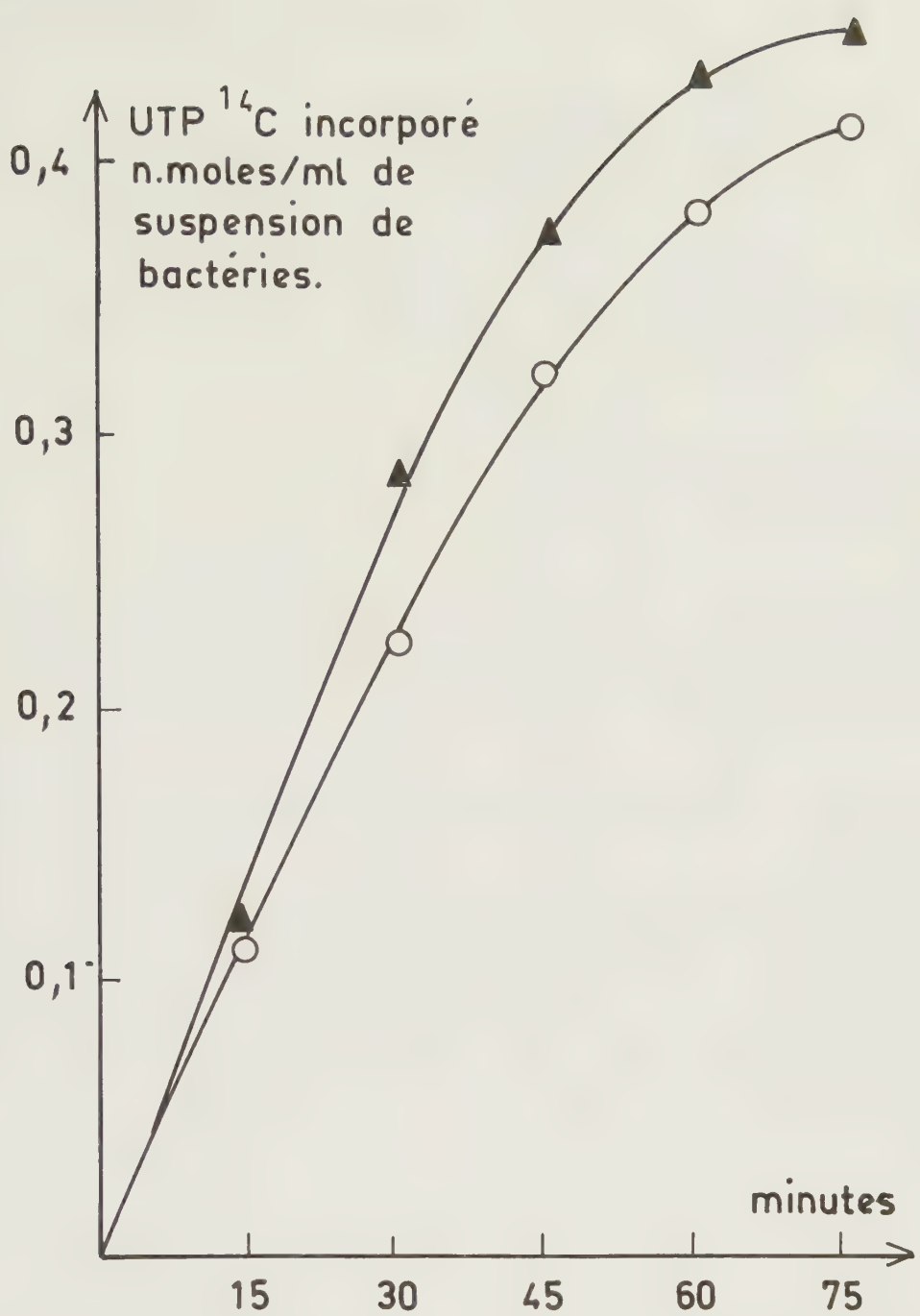


Figure 26 - Incorporation de UTP ^{14}C dans l'ARN d'E.coli 15 TAU RC^{str}

Les conditions ont été identiques à celles décrites dans la figure 23. Les ribonucléosides triphosphates : CTP, GTP, ATP ont été introduits à la concentration de 0,5 µM/ml de chaque et le UTP ^{14}C 0,1 µM/ml (0,5 µCi).
(O) témoin ; (Δ) canavanine, 730 µM.

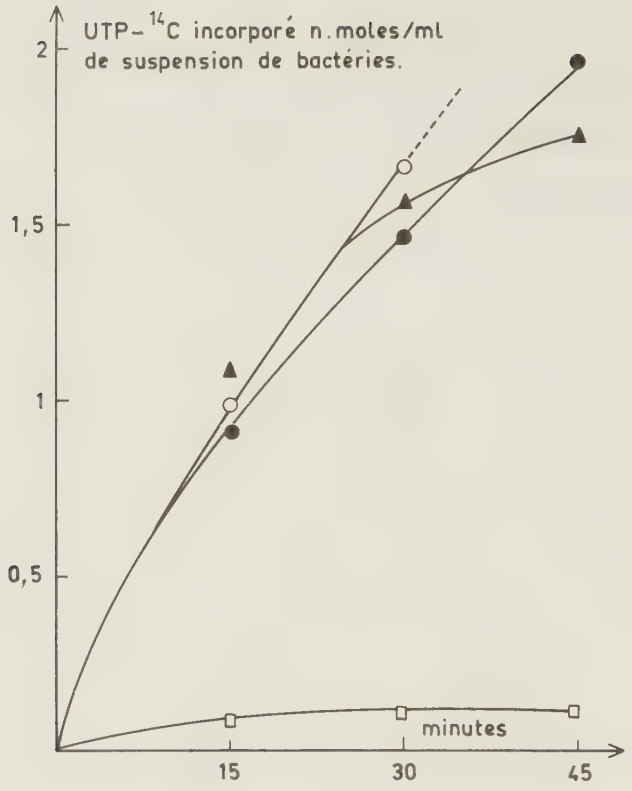


Figure 27 - Incorporation de UTP ^{14}C dans l'ARN d'E.coli 15 TAU RC^{rel}

Les conditions ont été identiques à celles décrites dans la figure 23. Les ribonucléosides triphosphates : CTP, GTP, ATP ont été introduits à la concentration de 0,5 µM/ml de chaque et le UTP ^{14}C 0,1 µM/ml, (0,5 µCi).
(O) témoin ; (▲) canavanine, 730 µM ; (●) canavanine, 730 µM, et chloramphénicol, 25 µg/ml ; (□) actinomycine, 125 µg/ml.

DISCUSSION

Les résultats qui ont été décrits, montrent que dans les souches d'E.coli RC^{str} déficientes en arginine et carencées en cet acide aminé, la synthèse de l'ARN est restaurée si l'on fournit à la culture de la canavanine. Les mécanismes d'action de la canavanine dans ce processus n'ont pas été étudiés, mais il est hautement probable que son rôle est le même que celui observé avec d'autres analogues d'aminoacides. En effet, FANGMAN et NEIDHARDT (1964) ont montré que la p-fluorophénylalanine relâche la synthèse d'ARN seulement dans les souches qui possèdent une phénylalanyl-t ARN-synthétase capable d'utiliser cet analogue à la place de la phénylalanine.

La canavanine est utilisée par l'arginyl-t ARN-synthétase d'E.coli et nous avons vérifié que toutes les souches utilisées dans ce travail incorporent la

canavanine dans leurs protéines. L'absence d'effet de l'homoarginine s'explique par le fait que l'arginyl-t ARN-synthétase n'utilise pas cet analogue (ALLENDE, 1964).

Dans les souches RC^{rel} carencées en arginine, la canavanine provoque une modification de l'incorporation de l'uracile ^{14}C dans l'ARN. Pendant la première heure d'incubation l'incorporation est considérablement réduite par rapport à la culture témoin carencée puis, cette incorporation s'arrête. Un tel résultat pourrait s'expliquer par la formation d'un ARN métaboliquement instable, et l'arrêt de synthèse après une heure ne serait qu'apparent et correspondrait à un équilibre entre une synthèse et une dégradation. Cette hypothèse doit cependant être éliminée puisque la durée de vie de l'ARN formé en présence et en absence de canavanine est sensiblement la même.

On dispose de peu d'informations sur la synthèse de l'ARN chez les souches relaxes en présence d'analogues structuraux d'aminoacides. CHENG et HARTMAN (1968) en utilisant la souche d'E.coli K 12 : 58161 $mét^-$ RC^{rel} ont montré que l'éthionine, analogue structural de la méthionine et qui est incorporée dans les protéines, est sans effet sur la synthèse de l'ARN.

Tenant compte de ce résultat, les observations rapportées dans ce travail semblent montrer que la canavanine agirait d'une façon spécifique chez les souches d'E.coli RC^{rel} au niveau d'une étape de régulation de la synthèse des ARN. Il est curieux de constater que le chloramphénicol rétablit cette synthèse arrêtée par la canavanine.

GALLANT et CASHEL (1967) ont montré que dans le cas des souches RC^{str} dont les cellules ont été rendues perméables aux ribonucléosides phosphates par une plasmolyse, l'incorporation de l'AMP dans l'ARN est sous la dépendance de la présence des acides aminés indispensables. Par contre, ces cellules incorporent l'UTP même lors d'une carence en acide aminé. Dans des conditions identiques avec les cellules RC^{str} exigentes en arginine et plasmolysées, nous avons observé une stimulation de l'incorporation de l'UMP et de l'UDP par la canavanine, mais par contre, aucune modification de l'incorporation de l'UTP. Dans le cas des souches RC^{rel}, la canavanine inhibe l'incorporation de l'uracile, de l'UMP et de l'UDP, alors qu'elle est sans effet sur l'incorporation de l'UTP. Ces derniers résultats et ceux obtenus avec la souche RC^{str} semblent indiquer que la canavanine agit sur le régulation de la synthèse des nucléosides triphosphates à partir de diphosphates. Elle stimulerait cette synthèse chez les souches stringentes, et elle l'inhiberait chez les souches relaxes.

Ces effets contraires de la canavanine chez les deux types de souches pourraient s'expliquer par des différences dans le fonctionnement de leur nucléosides-diphosphates-kinase en présence de cet analogue.

VII - SYNTHESE DE L'ADN EN PRESENCE DE CANAVANINE

INTRODUCTION

MAALOE et HANAWALT (1961) ; LARK, REPKO et HOFFMAN (1963), avaient montré que, dans des bactéries carencées en acide aminé indispensable, la synthèse de l'ADN se poursuit pendant un temps d'environ 10 à 20 minutes, à une vitesse sensiblement identique à la synthèse dans des cellules non carencées. Mais ensuite, la vitesse de synthèse décroît et, après 40 à 60 minutes, elle est stoppée. Cette cinétique de synthèse de l'ADN a été interprétée comme résultant de la terminaison de la synthèse des molécules d'ADN dont la réplication avait déjà débuté avant la carence en acide aminé.

Dans ce travail, nous avons étudié la cinétique de l'incorporation de la thymidine ^{3}H dans l'ADN de bactéries des souches résistantes et de celles sensibles à la canavanine. Dans ce dernier cas, la synthèse a été mesurée dans les conditions d'incubation dans lesquelles il y a ou non perte de viabilité.

Les résultats obtenus montrent que lorsqu'il y a perte de viabilité, les courbes d'incorporation de thymidine ^{3}H dans l'ADN sont les mêmes que celles obtenues dans le cas de cultures carencées en arginine. Par contre, dans les cas où il n'y a pas perte de viabilité en présence de canavanine, les courbes sont différentes.

MATERIEL ET METHODES

Les cultures de bactéries en phase de croissance exponentielle sont lavées sur filtre Millipore (PHWP 047 pH 0,3 µ) et resuspendues dans du milieu minéral de Davis complété avec : glucose 0,4 % ; thymidine ^{3}H 0,1 µCi/4 µg/ml et, si les conditions l'exigent, mélange d'acides aminés, uracile 20 µg/ml et de déoxyguanosine 200 µg/ml.

Les suspensions sont incubées dans un bain-marie à 37°C avec agitation. Aux temps : t_o et à ceux indiqués sur les graphiques, 2 fois 0,5 ml de suspension sont prélevés, versés dans 0,5 ml d'acide trichloracétique à 10 % froid. Après avoir été maintenus pendant 15 à 30 minutes à froid, les précipités sont récupérés sur filtres de fibres de verre Whatman GF/C et lavés avec de l'acide trichloracétique à 5 %, puis de l'éthanol froid. Les filtres sont séchés sous une lampe à rayonnement infra-rouge, puis introduits dans des fioles avec : 10 ml de mélange scintil-

lant (toluène : 1 litre, PPO 4 g et diméthyl POPOP 0,1 g).

La radioactivité est mesurée avec un compteur à scintillateur liquide.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les courbes d'incorporation de thymidine ^{3}H dans l'ADN d'E.coli B arg^{-} ou E.coli K 12 thy^{-} arg^{-} carencés en arginine, ou incubés en présence de canavanine, sont à peu près identiques (figures 28 et 29), avec cependant une quantité toujours légèrement supérieure dans le cas où la canavanine est fournie.

Dans les deux cas, l'incorporation de thymidine ^{3}H se poursuit pendant environ 60 minutes et ensuite s'arrête.

Le calcul des quantités de thymidine incorporée dans ces cultures par rapport à celles incorporées en présence d'arginine, montre que l'accroissement de la quantité d'ADN, dans les cultures carencées ou en présence de canavanine, est d'environ 50 %. Les synthèses d'ADN dans les cultures carencées ou en présence de canavanine semblent bien correspondre à des synthèses de terminaison des cycles de réplication de l'ADN.

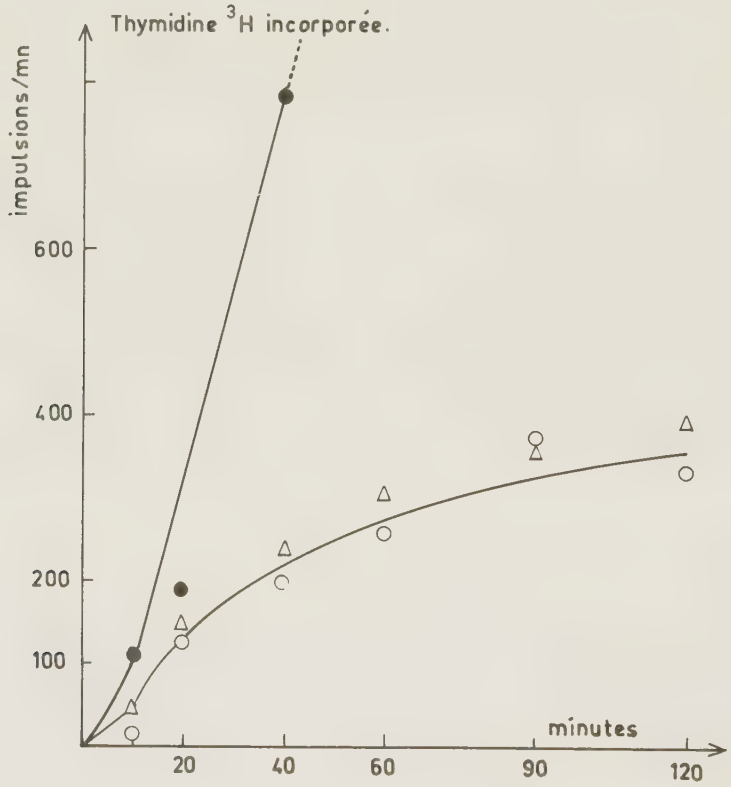


Figure 28 - Incorporation de thymidine ^{3}H dans l'ADN d'E.coli B arg^{-}

Des cellules en phase de croissance exponentielle sont lavées et remises en suspension dans du milieu de Davis complété avec : glucose 0,4 %, acides aminés, thymidine ^{3}H 4 µg/ml (0,1 µCi/ml) (O), canavanine 200 µg/ml (Δ) ou arginine 50 µg/ml (●).

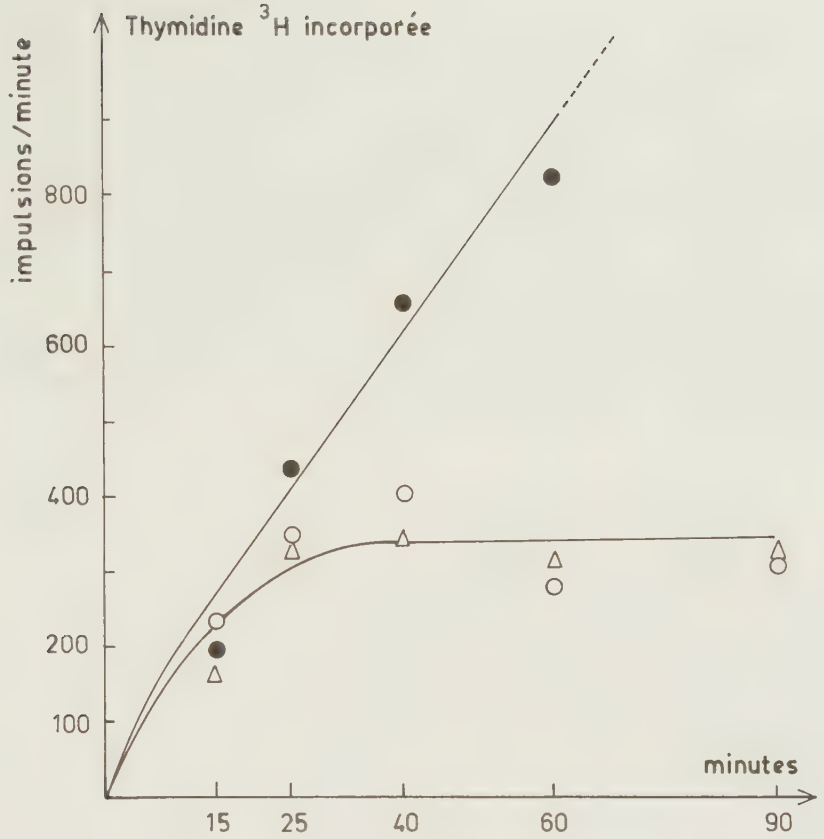


Figure 29 - Incorporation de thymidine ^{3}H dans l'ADN d'E.coli K 12 thy$^-$ arg$^-$

Des cellules en phase de croissance exponentielle sont lavées et remises en suspension dans du milieu de Davis complété avec : glucose 0,4 %, acides aminés, thymidine ^{3}H 4 µg/ml (0,1 µCi/ml) (O),canavanine 200 µg/ml (Δ), ou arginine 50 µg/ml (●).

On a vu précédemment que le chloramphénicol, par son action inhibitrice de la synthèse des protéines, protège les cellules de la mort par la canavanine (figure 12). On constate que, si cet antibiotique est introduit dans les cultures faites en présence ou en absence de canavanine, il stimule l'incorporation de la thymidine ^{3}H (figure 30). En présence de chloramphénicol et d'arginine, les mêmes quantités de thymidine ^{3}H sont incorporées.

LARK et LARK (1964) ont montré que chez les souches de bactéries exigeantes en acides aminés, l'apport de ces acides aminés et de chloramphénicol stimule la synthèse de l'ADN par rapport à une culture carencée et sans chloramphénicol.

Sur la base de ces résultats et de ceux d'autres expériences, ces auteurs ont proposé le modèle suivant de régulation de la réplication de l'ADN.

Le point de départ de la réplication de l'ADN serait constitué par une protéine structurale. Le départ de la réplication serait sous la dépendance d'une protéine initiateur qui se déplacerait le long du chromosome, accompagnant le point de réplication. Lorsque le cycle de réplication serait terminé, une nouvelle protéine structurale et un nouvel initiateur seraient synthétisés. Ces synthèses nécessi-

tent évidemment la présence de tous les acides aminés.En présence de chloramphénicol la protéine de structure pourrait être synthétisée, mais pas l'initiateur, et ceci aurait pour conséquence la réplication d'un seul des deux chromosomes.

Nos résultats montrent qu'en présence de canavanine, le chloramphénicol stimule la synthèse de l'ADN (figure 31). Ce fait peut s'expliquer en supposant que, pour la synthèse de la protéine de structure, la canavanine peut remplacer l'arginine et conduire à la formation d'une protéine active.

Si l'on admet, comme l'ont proposé SCHACHTELE et ROGERS (1965) que la cause de l'action léthale de la canavanine est due à son incorporation dans le système protéique qui régule la réplication de l'ADN, il faudrait supposer que cette action léthale ne soit pas due à l'incorporation de la canavanine dans la protéine de structure, mais dans la protéine initiateur. Cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée.

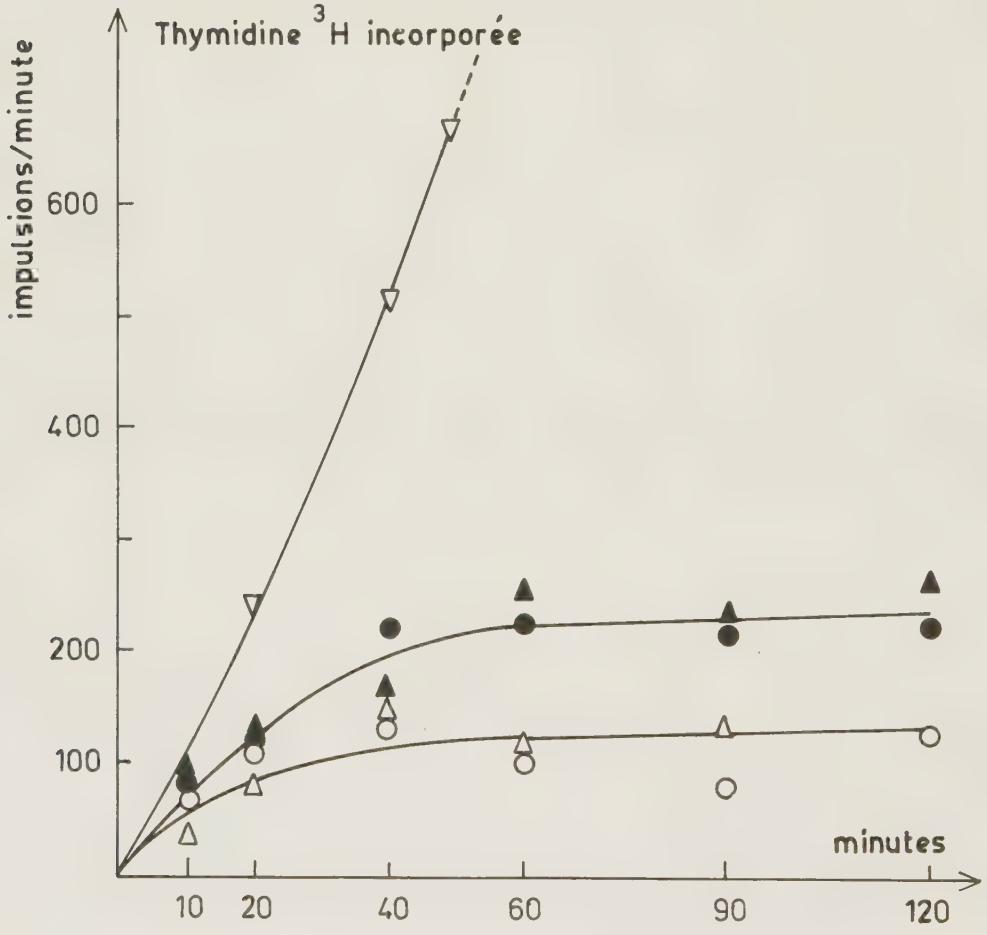


Figure 30 - Influence du chloramphénicol sur l'incorporation de la thymidine ^{3}H

Des cellules, d'E.coli B arg$^-$, en phase de croissance exponentielle sont lavées et remises en suspension dans du milieu de Davis avec glucose 0,4 %, acides aminés, et thymidine ^{3}H 4 µg/ml (0,1 µCi/mg) (O), canavanine 200 µg/ml (Δ), canavanine 200 µg/ml et chloramphénicol 25 µg/ml (▲), chloramphénicol 25 µg/ml (O), arginine 50 µg/ml (∇).

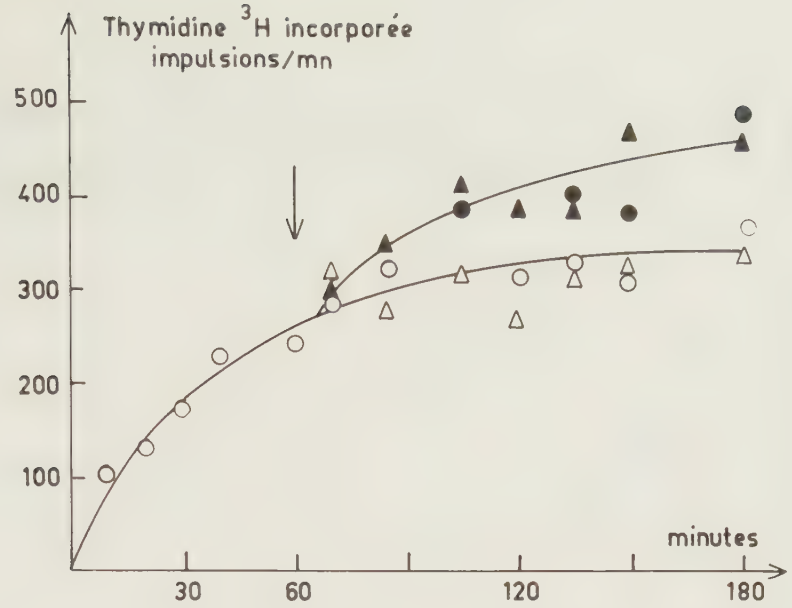


Figure 31 - Incorporation de la thymidine ^{3}H dans l'ADN

Des cellules, d'E.coli B arg$^-$, en phase de croissance exponentielle sont lavées et remises en suspension dans du milieu de Davis avec : glucose 0,4 %, acides aminés, thymidine ^{3}H, 4 µg/ml (0,1 µCi/ml) (O), après 60 minutes d'incubation (↓) sont ajoutés : canavanine 200 µg/ml (Δ), chloramphénicol 25 µg/ml (●), chloramphénicol 25 µg/ml et canavanine 200 µg/ml (▲), sans addition (O).

On a montré précédemment qu'il n'y avait pas de perte de viabilité des cellules en présence de canavanine, non seulement si du chloramphénicol était ajouté au milieu, mais aussi si les bactéries : E.coli B arg$^-$ sont incubées dans un milieu non enrichi en acides aminés (figure 13). Dans de telles conditions, c'est-à-dire en présence de canavanine et en absence d'acides aminés, la synthèse d'ADN est environ 3 fois plus importante que celle d'une culture sans canavanine (figure 32).

Dans la culture d'E.coli 15 thy$^-$ arg$^-$ ura$^-$ qui est résistante à la canavanine (figure 14), la synthèse de l'ADN en présence de canavanine est inhibée par rapport à la synthèse dans une culture carencée en arginine (figure 33).

Nous avons ainsi deux cas dans lesquels le traitement par la canavanine n'entraîne pas de perte de viabilité des bactéries et dans l'un desquels, par rapport à une culture carencée en arginine, la canavanine stimule la synthèse de l'ADN, et dans l'autre où elle l'inhibe.

A partir de ces derniers résultats et de ceux décrits précédemment, il n'est pas possible de tirer de conclusions ou d'apporter une hypothèse sur le mécanisme de l'action léthale de la canavanine.

Cependant, si l'on retient l'hypothèse de SCHACHTELE et ROGERS, on y apporte une précision suivant laquelle la perte de viabilité, causée par la canavanine, n'est pas due à son incorporation dans la protéine structurale qui régule la réplication de l'ADN. L'action léthale de la canavanine serait donc le résultat de l'incorporation de cet analogue dans la protéine initiateur de la réplication de l'ADN.

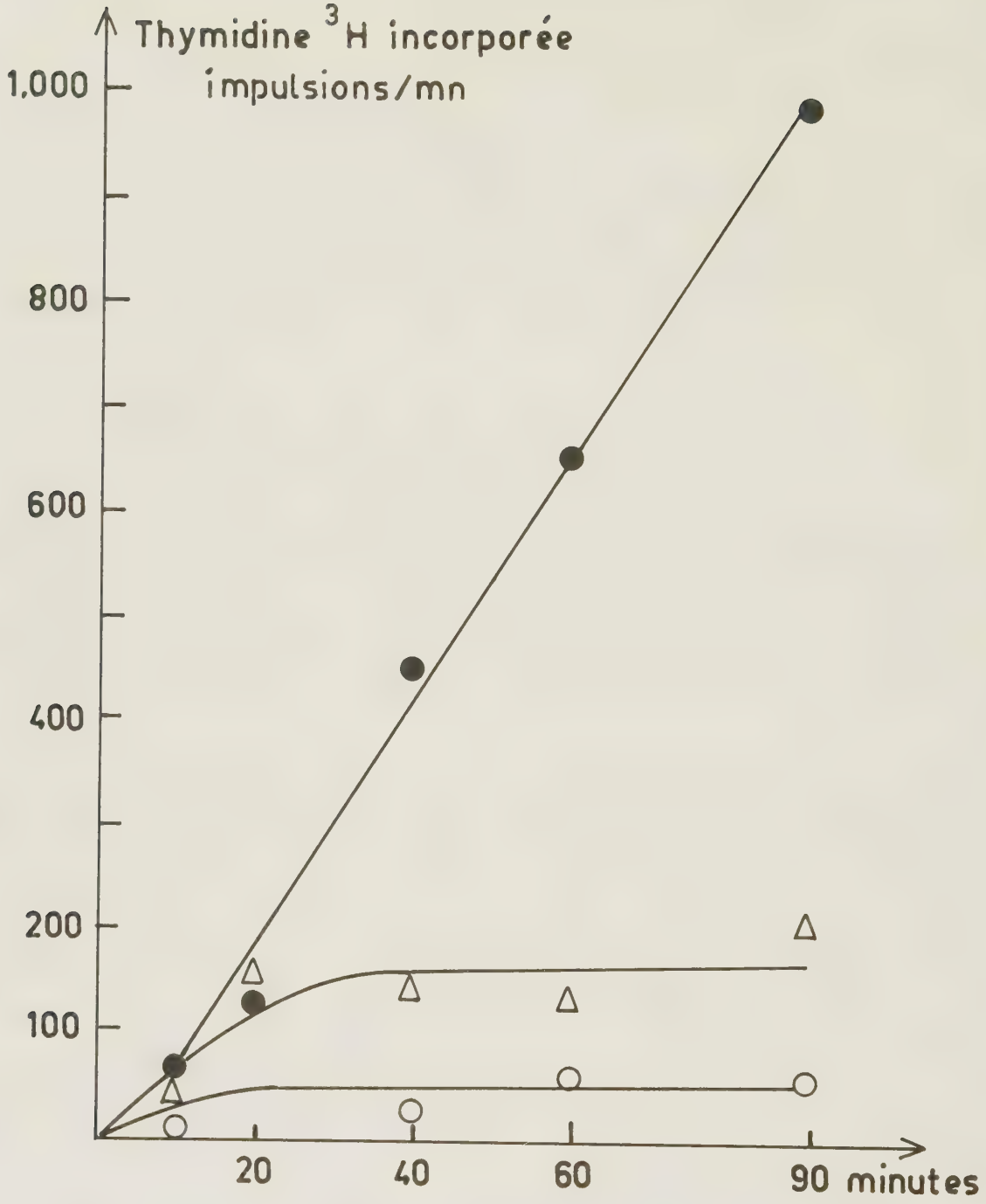


Figure 32 - Incorporation de thymidine ^{3}H dans l'ADN d'E.coli B arg$^-$ incubée dans un milieu non enrichi en acides aminés.

Des cellules en phase de croissance exponentielle sont lavées et remises en suspension dans du milieu de Davis avec : glucose 0,4 %, thymidine ^{3}H 4 µg/ml (0,1 µCi/ml) (O), canavanine 200 µg/ml (Δ), arginine 50 µg/ml (●).

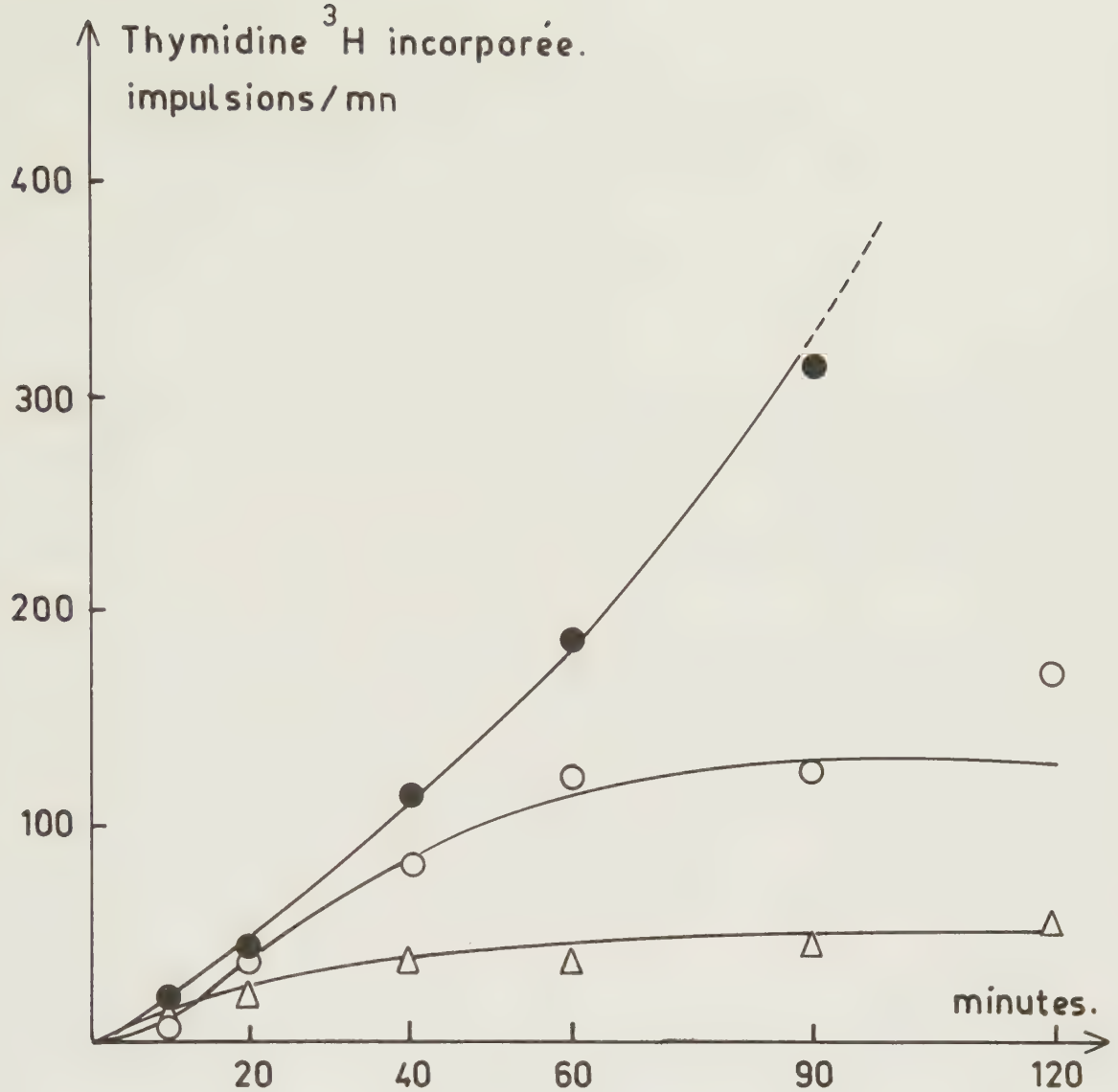


Figure 33 - Incorporation de thymidine ^{3}H dans l'ADN d'E.coli 15 TAU RC^{str}

Des cellules en phase de croissance exponentielle sont lavées et remises en suspension dans du milieu de Davis avec : glucose 0,4 %, thymidine ^{3}H 4 µg/ml (0,1 µCi/ml) (O), canavanine 200 µg/ml (Δ) ou arginine 50 µg/ml (●).

VIII - RELATION ENTRE L'ALTERATION DE LA STRUCTURE DE L'ADN ET LA VIABILITE D'E.coli EN PRESENCE DE CANAVANINE

INTRODUCTION

KLEINSCHMIDT, LAND et ZAHN (1961) et CAIRNS (1965) ont montré que le chromosome d'E.coli est constitué d'une seule molécule d'ADN et qu'il a une forme circulaire. JACOB, BRENNER et CUZIN (1963) ont ensuite émis l'hypothèse suivant laquelle le chromosome serait associé à la membrane cellulaire. Des études cytologiques faites par RYTER (1968) et RYTER, HIROTA et JACOB (1968) ont confirmé cette hypothèse.

D'autre part, Mc GRATH et WILLIAMS (1966) ont montré que lors de l'ultracentrifugation en gradient de sucrose alcalin, l'ADN d'E.coli sédimente en un seul pic. La centrifugation à 5 000 x g d'un lysat de cellules d'E.coli préparé dans des conditions telles que l'ADN n'est altéré ni chimiquement ni mécaniquement, conduit à l'obtention d'un culot de centrifugation qui est constitué par des fragments des membranes cellulaires et de la presque totalité de l'ADN, ROUVIERE, LEDERBERG, GRANBOULAN et GROS (1969). Avec des souches d'E.coli pol A^-, souches déficientes en ADN-polynérase I, STRALING et KNIFFERS (1971) ont montré que le système de replication de l'ADN sédimente avec le complexe formé par l'ADN et les fragments des membranes cellulaires.

Dans le présent travail, nous avons essayé d'établir une relation entre l'intégrité de la structure d'ADN et la survie de cellules en présence de canavanine. La canavanine est un analogue structural de l'arginine qui possède une action léthale vis-à-vis d'E.coli en inhibant de façon irréversible sa division cellulaire, SCHACHTELE et ROGERS (1965).

Les résultats montrent que dans le lysat de cellules incubées en présence de canavanine, et dont la survie est de 3 % environ 30 % de l'ADN ne sédimente plus à 10 000 x g avec la fraction membranaire. Cet ADN non sédimentable à 10 000 x g se sépare aussi du reste de l'ADN lors de sa centrifugation en gradient de sucrose alcalin. (SIMONNET et PARESYS RICHLI, 1972).

MATERIEL ET METHODES

Les bactéries sont incubées en aérobie à 37°C dans le milieu minéral liquide de DAVIS (1950) complété avec : glucose 0,4 %, mélange de 18 acides aminés, sauf arginine, (selon NOVICK et MAAS, 1961). Ce milieu est appelé "milieu non supplémenté". Pour la croissance des cellules, le milieu est supplémenté avec arginine : 50 µg/ml.

MARQUAGE RADIOACTIF DE L'ADN DES BACTERIES

Les bactéries sont incubées à 37°C dans le milieu supplémenté pendant 18 heures, puis repiquées à DO (650 mμ) = 0,05 dans le même milieu. A DO (650 m) = 0,1 on ajoute : thymidine ^3H 1 μg/ml (5 μCi/ml) et déoxyguanosine 50 μg/ml. L'incubation est poursuivie jusqu'à DO (650 mμ) = 0,4. Dans ces conditions de marquage, environ 15 % de la thymidine ^3H est incorporée dans l'ADN des bactéries.

INCUBATION EN PRESENCE DE CANAVANINE

A DO (650 mμ) = 0,4 les cellules marquées par la thymidine ^3H sont lavées avec du milieu minéral Davis dilué 100 fois et sont remises en suspension dans du milieu non supplémenté, avec de la canavanine 200 μg/ml, et incubées à 37°C.

Aux temps indiqués, des prélèvements sont effectués sur lesquels on mesure la viabilité des cellules et on examine l'état de l'association de l'ADN ^3H avec les membranes, et le profil de sédimentation de l'ADN en gradient de sucrose alcalin

LYSE DES CELLULES ET CENTRIFUGATION

La lyse des cellules est obtenue à l'aide d'une technique dérivée de celle décrite par : ROUVIERE et col. (1969).

Des fractions de 5 ml des suspensions de bactéries sont prélevées et versées dans 5 ml de TA froid (Tris-HCl 10^{-2} M, azide de sodium 2.10^{-2} M, pH 8,1). Après centrifugation à 12 000 x g à froid pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 0,1 ml de saccharose à 25 % dans le Tris-HCl 0,01 M pH 8,1. On ajoute : lysozyme à 100 μg/ml 10 μl, EDTA 0,5 M pH 8,1 5 μl, $MgCl_2$ 0,25 M 2 μl et 0,1 ml d'eau. Après 5 minutes à froid, la lyse complète est obtenue par addition de 50 μl d'une solution à 10 % de lauryl sulfate de sodium. On ajoute 0,8 ml de TM_2 bis (Tris-HCl 1.10^{-2} M pH 7,5, $MgCl_2$ 10^{-2} M).

Ce lysat est centrifugé à froid à 10 000 x g pendant 10 minutes. 0,1 ml de surnageant est versé dans 2 ml de TCA à 5 % froid. Le culot est remis en suspension dans 1 ml de tampon TM_2 ter (TM_2 bis, NaCl 4.10^{-2} M) puis 0,1 ml est prélevé pour être précipité par 2 ml de TCA à 5 % froid.

Après 30 minutes à 2°C, les précipités sont recueillis sur filtres en fibres de verre Whatman GF/C, lavés avec du TCA à 5 %, puis avec de l'éthanol. Les filtres sont séchés et la radioactivité est mesurée par scintillation en milieu liquide. On calcule ensuite le pourcentage de radioactivité précipitable par le TCA (ADN ^3H) présent dans le surnageant, par rapport à la radioactivité totale précipitable par le TCA (ADN ^3H) : surnageant et culot.

TRAITEMENTS ENZYMATIQUES

1 - Hydrolyse des protéines

Le surnageant et le culot de centrifugation du lysat sont incubés à 37°C pendant 30 minutes en présence de 1 mg/ml de pronase.

2 - Hydrolyse des acides nucléiques

Les fractions sont d'abord incubées en présence de 1 mg/ml de pronase en milieu Na Cl 1,4 M, citrate de sodium 0,02 M pH 7,5. Après 30 minutes, on ajoute de l'acétate de potassium à 20 % pH 5, puis deux volumes d'éthanol. Le précipité est séparé par centrifugation, puis remis en suspension dans une solution de NaCl 1,4 M et 2 ml d'éthanol. Après une nouvelle centrifugation, le précipité est lavé par de l'éthanol. Le culot final est remis en suspension dans du tampon TA pH 7,5 et $MgCl_2$ 0,01 M. Des fractions aliquotes sont incubées à 37°C pendant 30 minutes :

a - sans addition
b - avec DNase : 100 µg/ml
c - avec RNase : 50 µg/ml

Après les traitements par la pronase, la DNase ou la RNase, les fractions non hydrolysées sont précipitées par le TCA à 10 %. Les précipités sont recueillis sur filtre comme indiqué ci-dessus (voir : lyse des cellules et centrifugation).

ULTRACENTRIFUGATION DE L'ADN EN GRADIENT DE SUCROSE

Après incubation, 5 ml de suspension sont prélevés, les cellules sont récupérées puis lavées avec du tampon Tris-HCl, 0,1 M pH 8,20.

Le culot est finalement resuspendu dans 0,1 ml de tampon Tris-HCl, 0,1 M pH 8,2 et 0,35 ml de saccharose 0,5 M. Après équilibre à la température de 25°C on ajoute 40 µl d'une solution de lysozyme à 2 mg/ml puis 20 µl d'EDTA à 4 % pH 8,2. La suspension est incubée pendant 4 minutes afin d'obtenir la formation de sphéroplastes. La suspension de sphéroplastes est diluée au 1/2 dans de l'eau distillée froide et 50 µl sont déposés à la surface d'un gradient de sucrose alcalin pH 12 (5 % à 30 %).

Le gradient est centrifugé dans un rotor Beckman SW 4 1 pendant 1 h 30 à 35 000 t/minute à 20°C.

Après centrifugation le gradient est fractionné en environ 50 parties, chacune est récupérée sur filtre Whatman 3 MM. Tous les filtres sont plongés dans du TCA à 5 % froid qui est changé une fois, puis dans de l'éthanol froid. Lorsque les filtres sont secs leur radioactivité est mesurée par scintillation en milieu liquide en présence de butyl PBD-toluène (5 g par litre), dans un compteur Intertechnique SL 40.

MESURE DE LA DEGRADATION DE L'ADN

Des prélèvements de 1 ml de suspension de bactéries sont centrifugés, et après élimination du surnageant, le culot est dispersé dans 1 ml d'acide trichloracétique à 10 % froid. Après 30 minutes le précipité est centrifugé à 10 000 t/minute pendant 5 minutes à froid et une fraction aliquote du surnageant est prélevée. La radioactivité de cette fraction acido-soluble est mesurée dans 10 ml de mélange scintillant composé de : toluène 1 litre, Triton x 100 330 ml, PPO 4 g et diméthyl POPOP 0,1 g.

RESULTATS

On a vu précédemment que E.coli B arg⁻ ou E.coli CP 79 arg⁻ his⁻ thr⁻leu⁻ thi⁻ incubées dans du milieu sans arginine, mais renfermant tous les autres acides aminés et de la canavanine, perdent leur aptitude à se diviser (figures 10 et 11). Par contre, il n'y a pas de perte de viabilité si le milieu d'incubation ne renferme pas le mélange des autres acides aminés (figure 13). E.coli CP 79 arg⁻ his⁻ thr⁻ leu⁻ thi⁻ carencé en leucine et incubé en présence de canavanine, conserve également entièrement sa viabilité (figure 11).

C'est dans ces différentes conditions d'incubation, c'est-à-dire lorsqu'il y a ou non perte de viabilité,que nous avons examiné l'état de la structure de l'ADN par centrifugation à 10 000 x g du lysat cellulaire.

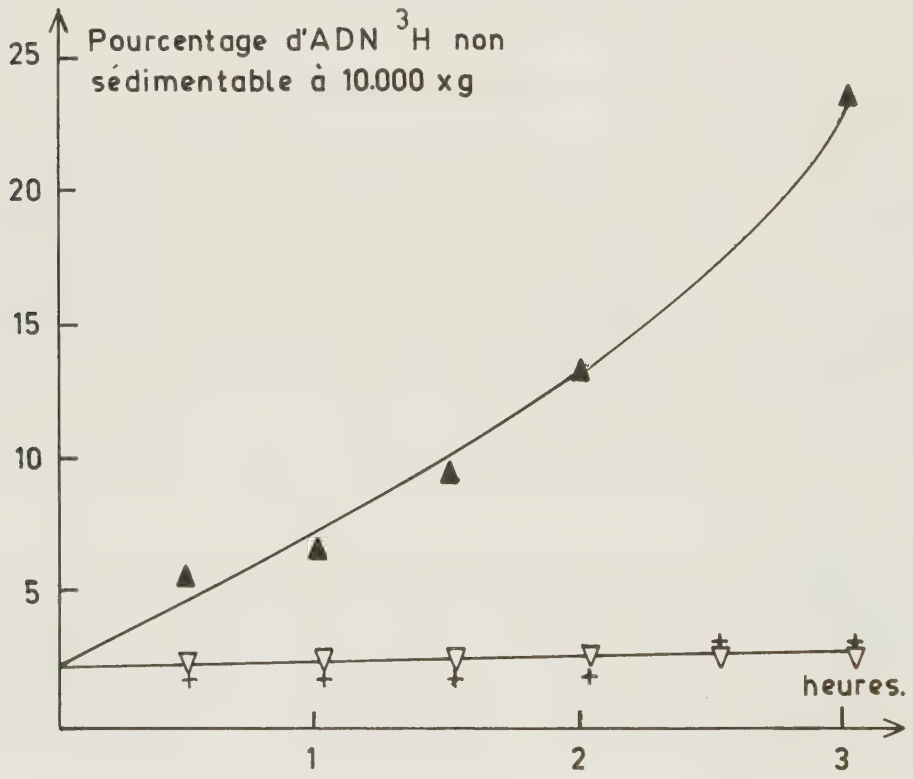


Figure 34 - Pourcentage d'ADN ^{3}H non sédimentable à 10 000 x g E.coli B arg⁻

Une culture de bactéries en phase de croissance exponentielle, dont l'ADN a été marqué par de la thymidine ^{3}H est recueillie et lavée sur filtre Millipore, puis remise en suspension dans le milieu de Davis non supplémenté. Le milieu est complété comme indiqué ci-dessous et la suspension est incubée à 37°C. En fonction du temps, des fractions aliquotes de la suspension sont prélevées, les bactéries sont récupérées par centrifugation, puis lysées. Les lysats sont centrifugés à 10 000 x g à froid. Le surnageant et le culot sont séparés et précipités par le TCA à 5 %. Les précipités sont récupérés et lavés sur filtres de fibres de verre ; après séchage, leur radioactivité est mesurée, (▽) canavanine 200 µg/ml ; (△) canavanine 200µg/ml et acides aminés ; (+) arginine 50 µg/ml et acides aminés.

Chez les bactéries incubées dans les conditions qui n'entraînent pas de perte de viabilité, la fraction d'ADN ^{3}H qui ne sédimente pas à 10 000 x g avec les membranes, représente un pourcentage faible, environ 2,5 à 5 % de la radioactivité totale de l'ADN ^{3}H ; de plus, ce pourcentage reste constant pendant toute la durée de l'incubation (figures 34 et 35). Par contre, dans le cas de cellules incubées en présence de canavanine et dans les conditions où il y a une perte de viabilité, ce pourcentage augmente en fonction du temps pour atteindre de 15 à 25 % après les trois heures d'incubation (figures 34 et 35).

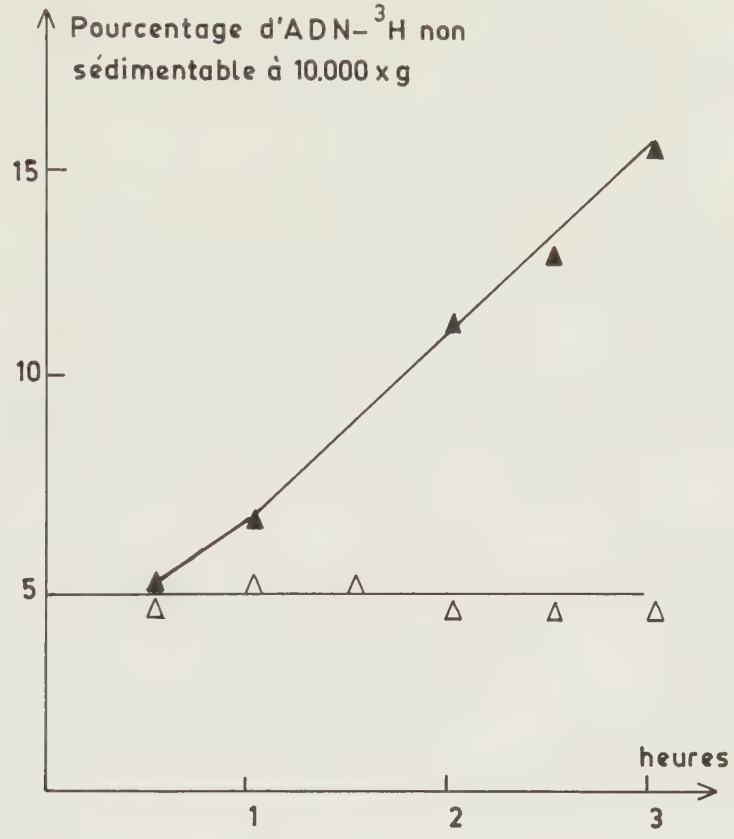


Figure 35 - Pourcentage d'ADN ^{3}H non sédimentable à 10 000 x g E.coli CP 79 arg^{-} leu^{-} his^{-} thr^{-} thi^{-}

Une culture de bactéries en phase de croissance exponentielle, dont l'ADN a été marqué par de la thymidine ^{3}H est recueillie et lavée sur filtre Millipore, puis remise en suspension dans le milieu de Davis non supplémenté. Le milieu est complété comme indiqué ci-dessous et la suspension est incubée à 37°C. En fonction du temps, des fractions aliquotes de la suspension sont prélevées, les bactéries sont récupérées par centrifugation, puis lysées. Les lysats sont centrifugés à 10 000 xg à froid. Le surnageant et le culot sont séparés et précipités par le TCA à 5 %. Les précipités sont récupérés et lavés sur filtres de fibres de verre ; après séchage, leur radioactivité est mesurée. (▲) canavanine 200 µg/ml et acides aminés, (Δ) canavanine 200 µg/ml et acides aminés sauf la leucine.

Les résultats reportés dans le tableau 3 montrent que la radioactivité contenue dans les précipités TCA des surnageants et des culots était bien associée à de l'ADN. En effet, après les traitements de ces fractions par la RNase ou la pronase, toute la radioactivité reste associée à une fraction précipitable par le TCA. Seul le traitement par la DNase entraîne une diminution de la radioactivité précipitable par le TCA.

Tableau 3

TRAITEMENTS ENZYMATIQUES DES FRACTIONS RADIOACTIVES

Fractions	Pourcentage de radioactivité précipitable par le TCA après traitement par :			
	Témoin	RN ase	Pronase	DN ase
Culot	95	100	100	13
Surnageant	85	100	97	5

Le surnageant et le culot de centrifugation d'un lysat de cellules traitées par la canavanine sont soumis aux traitements enzymatiques (voir Matériel et Méthodes). Après traitement; on détermine quelle fraction est encore précipitable par le T.C.A.

Après un traitement des cellules par la canavanine, dans des conditions où il y a perte de viabilité, la canavanine est éliminée et les cellules sont remises en suspension dans un milieu avec arginine. Ce traitement a pour effet d'arrêter la perte de viabilité et après une période de latence d'environ une heure, les cellules restées viables reprennent leur division (figure 36).

Cependant, durant cette période de latence et au-delà, la quantité d'ADN^{3}H qui ne sédimente pas à 10 000 x g avec les membranes continue d'augmenter mais avec une vitesse plus faible (figure 37) que celle correspondant à la période pendant laquelle il y a perte de viabilité.

Parmi les analogues d'acides aminés, nous avons également examiné l'action éventuelle d'un analogue du tryptophane, l'azatryptophane. Celui-ci ne provoque pas d'action léthale et n'entraîne pas non plus de variation de la quantité d'ADN^{3}H non sédimentable à 10 000 x g (figure 38), bien qu'il soit incorporé dans les protéines d'E.coli (PARDEE et col., 1956). Le pourcentage d'ADN^{3}H dans le surnageant de centrifugation du lysat de ces cellules est de 4 % et reste le même pendant toute la durée de l'incubation.

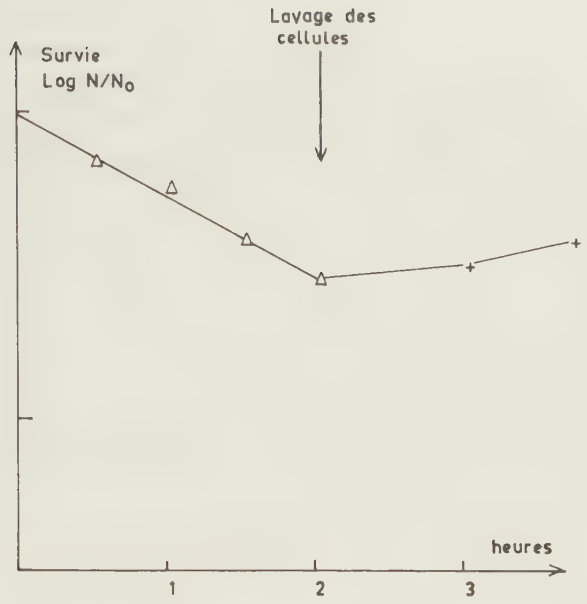


Figure 36 - Viabilité d'E.coli B arg$^-$ en présence de canavanine et après addition d'arginine.

Dans une même suspension de bactéries, on a suivi simultanément la viabilité des cellules et l'état de l'association du complexe ADN-membrane (figure 37). Les bactéries sont incubées en présence de canavanine : 200 µg (Δ) puis lavées (↓) et remises en suspension dans un milieu avec arginine 50 µg/ml (+).

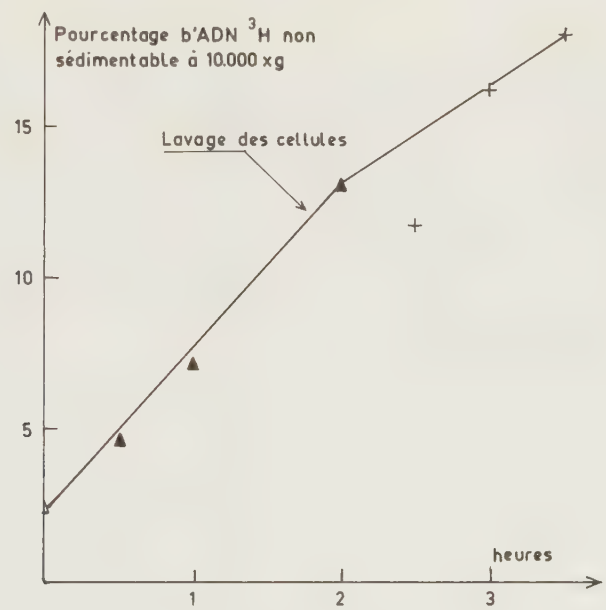


Figure 37 - Pourcentage d'ADN^{3}H non sédimentable à 10 000 x g d'E.coli B arg$^-$ en présence de canavanine et après addition d'arginine.

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans la légende de la figure 34. Mais après deux heures d'incubation en présence de canavanine à 200 µg/ml (Δ), les cellules sont lavées (↓) et remises en suspension dans un milieu avec arginine 50 µg/ml (+).

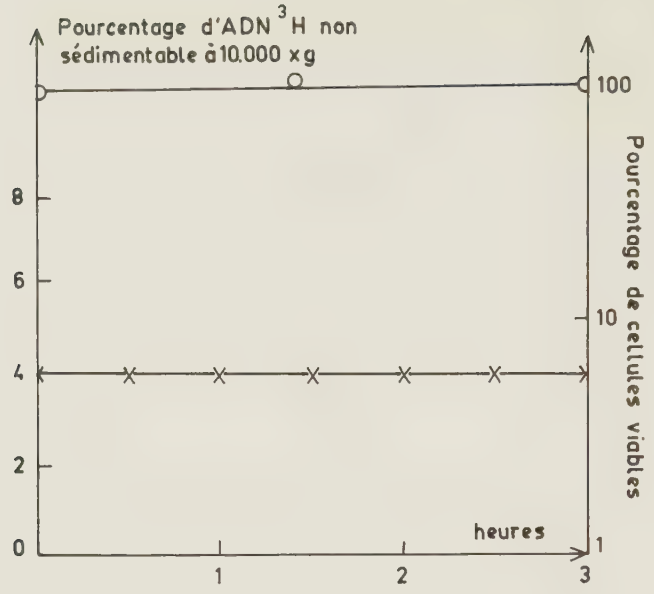


Figure 38 - Incubation d'E.coli 3426 his$^-$ try$^-$ en présence d'azatryptophane

Les bactéries sont incubées dans un milieu sans tryptophane et renfermant 100 µg/ml d'azatryptophane. Les autres conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans la légende de la figure 34. On a mesuré la survie (O) et l'état d'association du complexe ADN ^{3}H - membrane (x).

Dans la figure 39 ont été reportés les résultats d'un ensemble d'expériences indépendantes dans lesquelles on a mesuré en présence de canavanine, la perte de viabilité des cellules et la fraction d'ADN qui ne sédimente pas avec les membranes. Ces résultats montrent que le pourcentage d'ADN ^{3}H qui ne sédimente pas avec les membranes est d'autant plus grand que la viabilité des cellules est faible.

On peut penser, d'après ces premiers résultats, que l'augmentation de la quantité d'ADN ^{3}H dans le surnageant soit en rapport avec la perte de viabilité des cellules sous l'action de la canavanine.

L'examen de la structure de l'ADN, par ultracentrifugation à 150 000 x g en gradient de sucrose alcalin (figure 40) montre que l'ADN provenant de cellules traitées par la canavanine sédimente en se séparant en deux fractions, une des deux fractions d'ADN a un poids moléculaire sensiblement identique à l'ADN de cellules normales, c'est-à-dire cultivées en présence d'arginine, cette fraction représente 85 % de l'ADN. Une deuxième fraction d'ADN ne sédimentant pratiquement pas, dans les conditions de centrifugation, donc constitué d'ADN de poids moléculaire faible, mais assez homogène. Cette fraction légère représente 15 % de l'ADN total. Ce pourcentage d'ADN est voisin de celui qui constitue la fraction d'ADN qui ne sédimente pas avec la fraction membranaire par centrifugation à 10 000 x g.

Pour vérifier s'il s'agit bien du même type d'ADN dans les deux cas, l'ADN du surnageant 10 000 x g a été récupéré et déposé sur gradient de sucrose alcalin et centrifugé à 150 000 x g, dans ces conditions la totalité de cet ADN ne sédimen-

te pratiquement pas (figure 41) et se retrouve dans le gradient au même niveau que la fraction non sédimentable observée ci-dessus.

A cette altération de la structure de l'ADN en présence de canavanine n'est pas liée de dégradation de l'ADN en nucléotides (figure 42).

Des modifications de structure de l'ADN ont également été observées (Mc GRATH et WILLIAMS, 1966) à la suite de l'irradiation de micro-organismes par les rayonnements ionisants. De telles modifications peuvent évidemment aussi être produites par une auto-irradiation de l'ADN, par le rayonnement β^-, émis par le tritium de la thymidine incorporée dans l'ADN pour son marquage radioactif.

Il était donc nécessaire de vérifier que les altérations de l'ADN observées en présence de canavanine n'étaient pas dues en fait à des cassures de l'ADN produites par le rayonnement β^- émis par le tritium, cassures qui n'auraient pas pu être réparées par les systèmes enzymatiques de réparation des lésions de l'ADN.

Cette vérification est réalisée en utilisant, à la place de la thymidine ^3H comme marqueur radioactif, de la thymidine ^{14}C et en concentration radioactive de 1 µCi/ml soit cinq fois moins que la thymidine ^3H. Ceci réduit d'autant la dose d'irradiation de rayonnement β^- reçue par les bactéries.

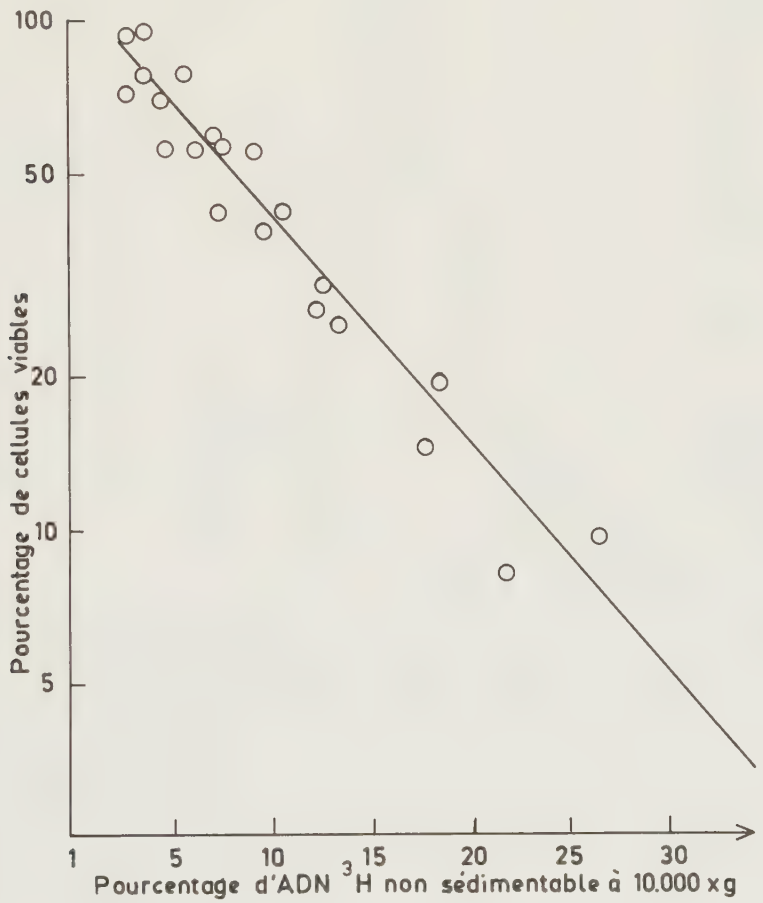


Figure 39 - Relation entre la viabilité des cellules (E.coli B arg$^-$) et le pourcentage d'ADN ^3H non sédimentable à 10 000 x g.
Sur ce graphique, on a regroupé les résultats d'expériences indépendantes.

Les résultats des expériences faites avec un marquage par la thymidine ^{14}C sont identiques à ceux obtenus par marquage par la thymidine ^{3}H. Ainsi les altérations de l'ADN observées en présence de canavanine ne résultent pas de cassures de l'ADN par irradiation β^-, cassures qui n'auraient pu être réparées en présence de canavanine.

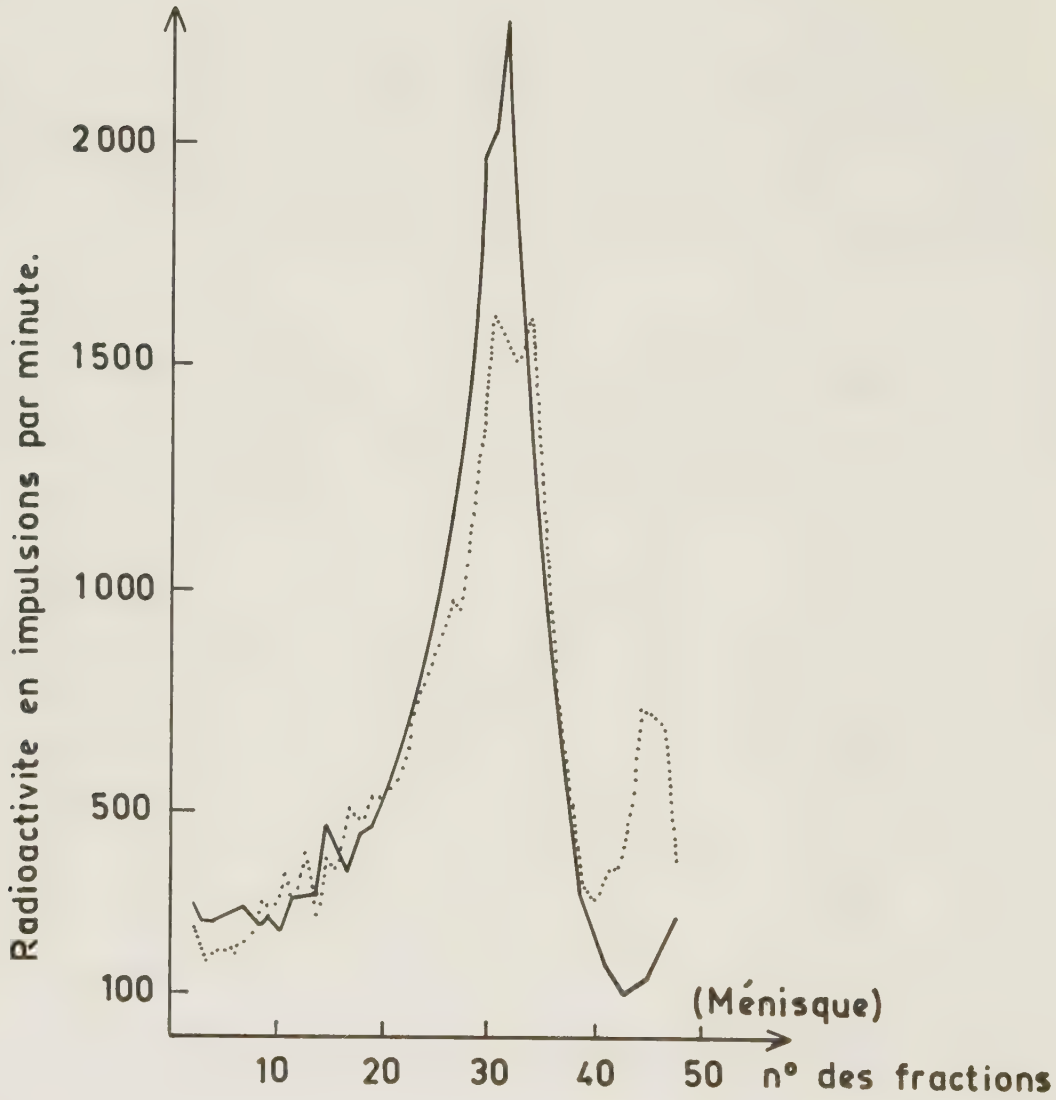


Figure 40 - Ultracentrifugation en gradient de sucrose alcalin de l'ADN

Des bactéries dont l'ADN est marqué par de la thymidine ^{3}H, sont incubées pendant 2 heures en présence d'arginine (-) ou de canavanine (...) puis transformées en sphéroplastes et lysées à la surface d'un gradient de sucrose alcalin 5 à 30 %. Les gradients sont centrifugés pendant 1 h 30 à 150 000 x g à 20°C. Après fractionnement du gradient la radioactivité TCA précipitable est mesurée.

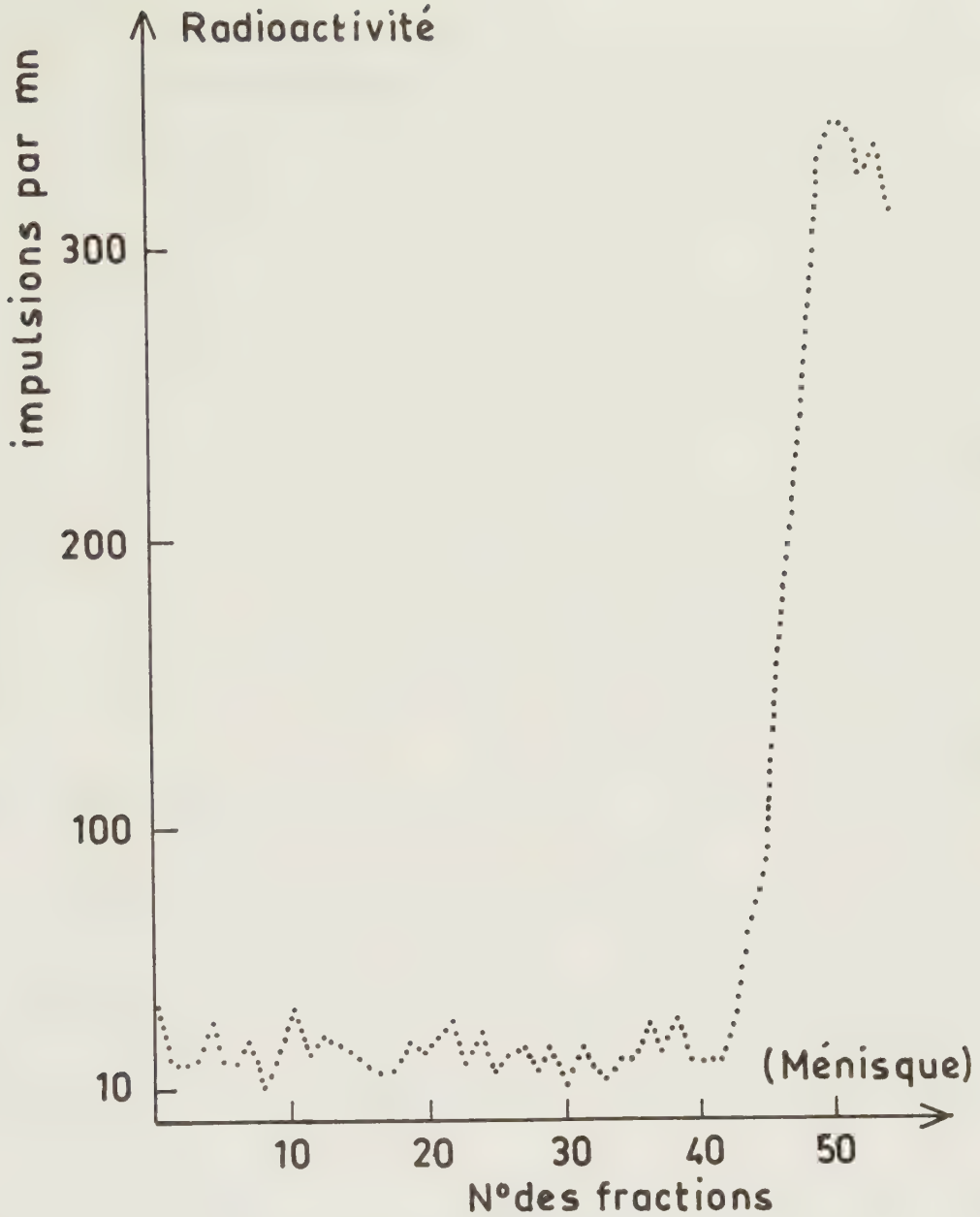


Figure 41 - Ultracentrifugation en gradient de sucrose alcalin de la fraction d'ADN non sédimentable à 10 000 x g.

Des bactéries dont l'ADN a été marqué par de la thymidine ^{3}H sont incubées en présence de canavanine, lysées et centrifugées à 10 000 x g. l'ADN contenu dans le surnageant est récupéré puis centrifugé en gradient de sucrose alcalin pendant 1 h 30 à 150 000 x g à 20°C. Après fractionnement du gradient la radioactivité TCA précipitable est mesurée.

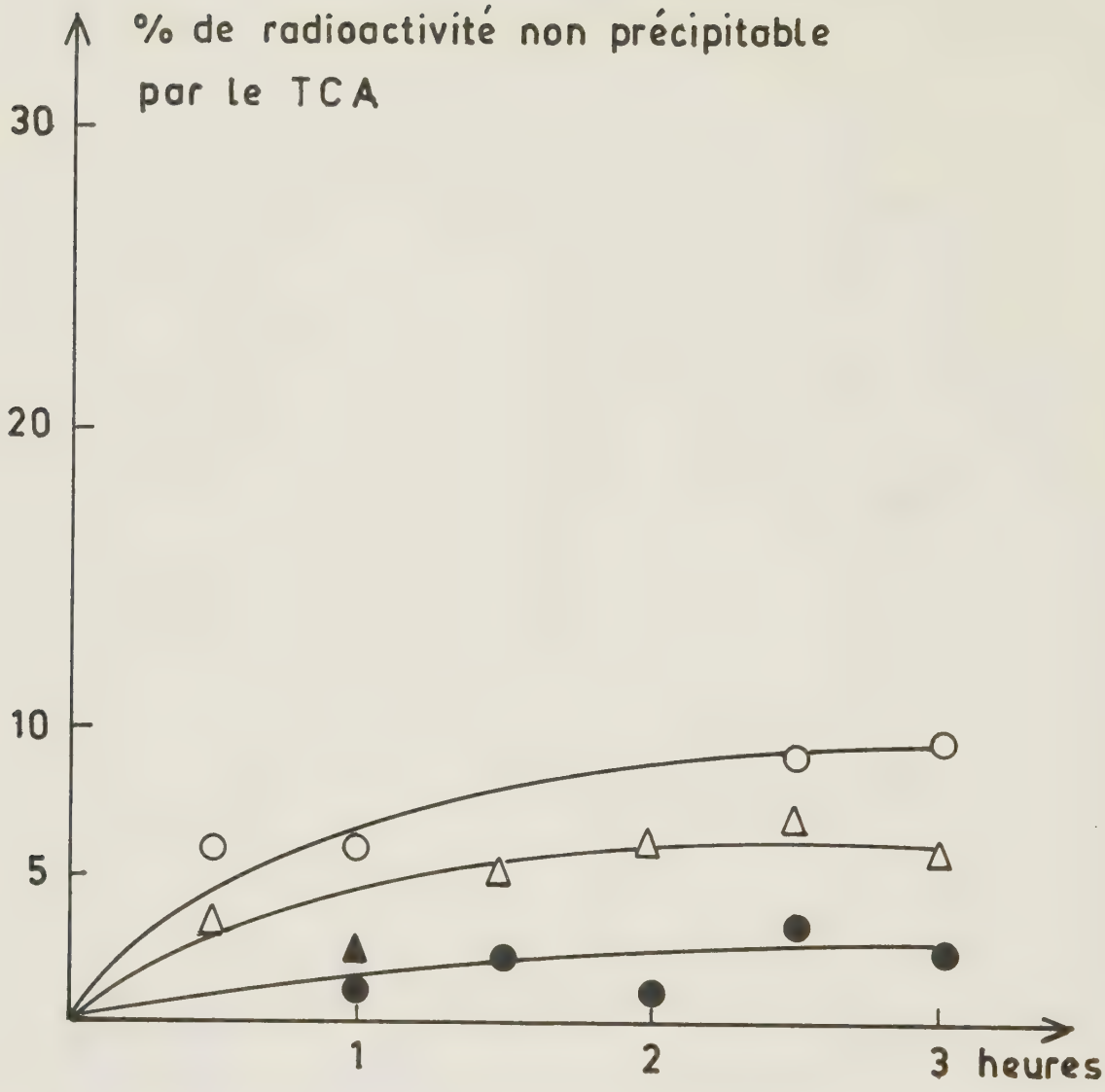


Figure 42 - Fraction de radioactivité non précipitable par l'acide trichloracétique.

Des bactéries dont l'ADN a été marqué par de la thymidine ^{3}H sont incubées en présence d'arginine (●) ou de canavanine (Δ), sans addition (O). Des prélèvements de 1 ml sont précipités par l'acide trichloracétique à 10 %. Ces précipités sont centrifugés et la radioactivité d'une fraction aliquote du surnageant est mesurée.

DISCUSSION

La technique de lyse cellulaire utilisée permet d'isoler dans un culot de centrifugation à basse vitesse (10 000 x g) l'ADN et les membranes cellulaires. Le surnageant de cette centrifugation ne renferme que quelques pourcents de l'ADN.

Cette technique de lyse a été appliquée à des suspensions d'E.coli ayant préalablement été soumises à un traitement par la canavanine qui avait entraîné une perte de viabilité ; dans ces conditions, tout l'ADN n'est pas retrouvé dans le culot de centrifugation, mais une partie plus ou moins importante reste dans le surnageant. La fraction d'ADN qui reste dans le surnageant est d'autant plus élevée que la viabilité des cellules est faible. Des cellules traitées par la canavanine mais carencées en un acide aminé conservent toute leur viabilité ; dans le lysat de telles cellules, l'ADN sédimente avec la fraction membranaire.

Ces résultats permettent de penser qu'il existe une relation entre la perte de viabilité des cellules en présence de canavanine et l'apparition de petits fragments de molécules d'ADN qui ne sédimentent pas à 10 000 x g.

La fraction d'ADN qui ne sédimente pas à 10 000 x g a également été isolée du reste de l'ADN par centrifugation en gradient de sucrose alcalin. Dans ces conditions de centrifugation il constitue un pic qui ne sédimente pratiquement pas. Cette fraction d'ADN doit donc être constituée par des fragments de molécules dont les poids moléculaires sont faibles mais assez homogènes. Ce dernier point permet de penser que les cassures de la molécule d'ADN n'interviennent pas au hasard le long de la molécule, car si non, on observerait dans le gradient, une distribution continue de l'ADN, depuis les molécules de poids moléculaires les plus élevées jusqu'aux plus faibles. Une telle répartition continue s'observe à la suite de cassure de l'ADN par irradiation par les rayonnements ionisants (Mc GRATH et WILLIAMS , 1966 et HOWARD-FLANDERS, 1968).

Les fragments d'ADN formés en présence de canavanine peuvent provenir soit de coupures de la totalité d'un nombre restreint de molécules d'ADN, soit au contraire résulter de la formation de quelques coupures mais d'un nombre plus important de molécules. Les présents résultats ne permettent pas de faire un choix entre ces hypothèses.

Qu'il s'agisse de l'un ou de l'autre de ces processus de coupure de l'ADN on conçoit que des cassures non réparables de la molécule d'ADN, entraînent une perte de viabilité des cellules.

Le mécanisme par lequel la canavanine entraîne des coupures de la molécule d'ADN n'est pas encore connu. On peut cependant penser que les coupures résultent soit de l'action d'endonucléase soit de modifications de structures de l'attachement de l'ADN à la membrane cellulaire.

En effet, la canavanine comme on l'a montré précédemment, peut s'incorporer dans les protéines à la place de l'arginine. Le détachement de l'ADN pourrait être dû à l'incorporation de la canavanine dans des protéines qui assurent le lien ADN-membranes et qui interviendraient aussi dans la réplication du chromosome.

La mise en évidence de ces cassures de l'ADN peut être rapprochée des études histologiques faites par SCHACHTELE et col. (1968) qui ont montré que dans les cellules traitées par la canavanine, le corps nucléaire était complètement désorganisé et dispersé dans la cellule.

CONCLUSION

Le présent travail a eu pour but d'étudier le mécanisme de l'action de la canavanine, analogue structural de l'arginine, sur les synthèses macromoléculaires et la viabilité de cellules.

Le matériel biologique utilisé pour cette étude a été des cellules bactériennes d'Escherichia coli.

Le choix de ce matériel biologique s'est fait à la suite d'une étude de la perméabilité de différents types de cellules vis-à-vis de la canavanine. Les mesures de perméabilité ont été faites sur les cellules d'Escherichia coli, d'érythrocytes et de réticulocytes de lapin et d'hépatome ascitique. Parmi ces cellules, ce sont celles d'E.coli qui ont montré la plus grande perméabilité vis-à-vis de la canavanine. Cet analogue pénètre dans les cellules d'E.coli par un mécanisme de transport actif qui, probablement, est le même que celui qui assure le transport de l'arginine.

Comme l'avait décrit SCHACHTELE et ROGERS (1965), nous avons observé que la canavanine inhibe de façon irréversible la division cellulaire de nombreuses souches d'E.coli.

La viabilité des cellules diminue sensiblement de façon exponentielle en fonction du temps d'incubation en présence de canavanine.

La perte de viabilité due à la canavanine est liée à l'incorporation de cet analogue dans les protéines. La canavanine est incorporée dans les protéines à la place de l'arginine. Dans les conditions où la canavanine ne peut pas s'incorporer dans les protéines du fait, soit de la présence dans le milieu de chloramphénicol, soit de l'absence d'un acide aminé indispensable, les cellules conservent toute leur viabilité.

L'effet léthal de la canavanine semblerait dû à la formation d'une ou plusieurs protéines anormales ; mais de telles protéines n'ont pas encore été mises en évidence.

La majorité de la canavanine est incorporée dans une fraction protéique qui, par centrifugation, sédimente avec les membranes cellulaires. Ces protéines constituent des organites sphériques d'environ 0,35 µ de diamètre. De tels organites ont également été observés dans une souche de bactéries résistante à la canavanine, ce qui semblerait exclure une relation directe entre la formation de ces organites et la perte de viabilité des cellules.

L'ensemble des observations précédentes montre essentiellement que la canavanine peut remplacer l'arginine dans la synthèse des protéines. Etant donné la relation qui existe entre la synthèse des protéines et la régulation des synthèses des acides nucléiques, nous avons examiné quelles étaient les actions de la

canavanine sur la régulation de la synthèse de l'ARN et de l'ADN.

La synthèse de l'ARN a été étudiée dans deux types de souches ; des bactéries arg^- RC^{str} et des bactéries arg^- RC^{rel}.

La carence en arginine des souches d'E.coli arg^- RC^{str} entraîne un arrêt de la synthèse de l'ARN. En présence de canavanine, cette synthèse est restaurée. La stimulation de la synthèse de l'ARN par des analogues d'acides aminés avait déjà été décrite ; l'on savait également que la stimulation ne peut avoir lieu que si l'analogue peut être utilisé par l'aminoacyl-t ARN-synthétase de l'acide aminé naturel. L'arginyl-t-ARN synthétase d'E.coli doit utiliser la canavanine puisque cet analogue est incorporé dans les protéines. Il est donc normal d'observer, dans les bactéries arg^- RC^{str} carencées en arginine, une stimulation de la synthèse de l'ARN par la canavanine.

Dans les souches de bactéries arg^- RC^{rel} soumises à une carence en arginine la synthèse de l'ARN se poursuit. L'addition au milieu d'incubation, de canavanine, a pour effet d'inhiber la synthèse de l'ARN. L'effet inhibiteur de la canavanine s'observe si l'on fournit aux cellules, comme précurseur de l'ARN, de l'uracile, de l'UMP ou de l'UDP. Par contre, on n'a pas observé, en présence de canavanine, d'inhibition de la synthèse de l'ARN, dans des cellules auxquelles est fourni de l'UTP.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par GALLANT et CASHEL (1967) qui ont montré que la régulation de la synthèse de l'ARN s'exerce au niveau de la formation des ribonucléotides triphosphates.

La canavanine aurait pour effet, dans les souches RC^{rel}, d'inhiber l'activité des ribonucléosides-diphosphates-kinase, alors qu'elle serait sans effet sur celles des souches RC^{str}.

Les relations entre la synthèse protéique et celle de l'ADN ont été décrites par MAALØE et HANAWALT (1961) ; LARK, REPKO et HOFFMAN (1963). Ces auteurs ont montré que la synthèse d'ADN ne peut se faire normalement que si la synthèse protéique a lieu. LARK et LARK (1964) ont suggéré l'existence de deux protéines qui régleraient la synthèse de l'ADN. La synthèse de ces protéines précèderait l'initiation d'un cycle de réplication.

Des cellules dans lesquelles la synthèse protéique est inhibée par carence en acide aminé indispensable, poursuivent la réplication de leur chromosome mais ne réinitient pas un nouveau cycle de réplication.

En présence de canavanine, la synthèse de l'ADN subit le même type de régulation qu'en carence d'acide aminé.

Ce fait a conduit SCHACHTELE et ROGERS (1965) à supposer que l'incorporation de canavanine dans ces protéines régulatrices, entraîne la perte de leur activité biologique, et finalement une action léthale.

Si cette interprétation est exacte, on pourrait préciser que des deux protéines régulatrices, seule celle qui initie la réplication de l'ADN doit perdre son activité biologique en présence de canavanine. Par contre, la seconde protéine régulatrice, qui est une protéine de structure, est synthétisée même en présence de chloramphénicol, et on a vu précédemment que cet antibiotique protège les cellules de l'action léthale de la canavanine.

Dans les cellules traitées par la canavanine, le blocage de la synthèse de l'ADN peut provenir, soit de l'incapacité des cellules à réinitier la réplication

de leur chromosome, du fait de la présence d'un initiateur biologiquement inactif, soit du fait d'une altération de la structure de l'ADN. Cette dernière éventualité a également été examinée et nous avons effectivement observé une modification de la structure de l'ADN.

SCHACHTELE, ANDERSON et ROGERS (1968) avaient observé que, dans des cellules traitées par la canavanine, le corps nucléaire était complètement désorganisé et dispersé dans la cellule. Si on soumet de telles cellules à une lyse, puis à une centrifugation à 10 000 x g, on observe que tout l'ADN ne sédimente pas avec la fraction membranaire. L'analyse par centrifugation en gradient de sucrose alcalin, de l'ADN de ces bactéries, a montré qu'une certaine proportion de l'ADN ne sédimente pas non plus à 150 000 x g. Il s'agit, dans les deux cas, de la même fraction de l'ADN, qui est constituée par des fragments d'ADN de faible poids moléculaire.

La proportion d'ADN qui ne sédimente pas est d'autant plus élevée que la viabilité des cellules est faible.

L'élimination de la canavanine du milieu d'incubation et son remplacement par de l'arginine ne permet pas la réparation des cassures de la molécules d'ADN. L'irréversibilité des cassures peut évidemment expliquer l'effet léthal de la canavanine. Peut-on admettre que les cassures de l'ADN ne sont pas une conséquence de la mort des cellules, mais au contraire que leur formation est responsable de la perte de viabilité des cellules ? Bien qu'il n'y ait pas actuellement d'arguments permettant un choix certain entre ces deux éventualités, nous proposons, dans l'état actuel des résultats, d'admettre l'hypothèse suivant laquelle la perte de viabilité des cellules bactériennes incubées en présence de canavanine est due à la formation de cassures de la molécule d'ADN.

BIBLIOGRAPHIE

ALLENDE C., ALLENDE J.E. (1964)
Purification and substrate specificity of Arginyl-Ribonucleic Acid Synthetase from Rat Liver. J. Biol. Chem. 239, 1102.

BELL E.A. (1958)
Canavanine and related compounds in leguminosae.
Biochem. J. 70, 617-619.

BELL E.A. (1960)
Canavanine in the leguminosae
Biochem. J. 75, 618.

BOREK E., RYAN A., ROCKENBACH J. (1955)
Nucleic acid metabolism in relation to the lysogenic phenomenon
J. BACTERIOL. 69, 460.

BORSOOK H., DEASY C.L., HAAGEN-SMIT A.J., KEIGHLEY G., LOWY P.M. (1952)
Incorporation in vitro of labeled aminoacids into proteins of rabbit reticulocytes
J. Biol. Chem. 196, 669.

CAIRNS J. (1963)
The bacterial chromosome and its manner of Replication as seen by Autoradiography
J. Mol. Biol. 6, 208-213.

CASHEL M., GALLANT J. (1968)
Control of RNA synthesis in E.coli
J. Mol. Biol. 34, 317.

CHENG T-Y, HARTMAN K.A. (1968)
Properties of ribosomes and ribosomal RNA formed by a relaxed mutant of E.coli during growth with ethionine.
J. Mol. Biol. 31, 191-207.

COHEN. GEORGES N. (1958)
Synthèse de protéines "anormales" chez E.coli K12 cultivé en présence de L-valine
Ann. Inst. Pasteur. 94, 15-30.

COHEN G.N., MUNIER R. (1959)
Effets des analogues struturaux d'aminoacides sur la croissance, la synthèse des protéines et la synthèse d'enzymes chez E.coli
Biochim. Biophys. Act. 31, 347-356.

DAMODARAN M., NARAYA NAN K.G.A. (1939)
The preparation of canavanine from canavalia obtusifolia
Biochem. J. 33, 1740.

DAVIS (1950)
Methods in medical research Vol. 3 Yearbook Publishers 1950, p. 5
LEDERBERG J., GERARD R.W.

FARLE W.R. (1943)
J. Nat. Canc. Inst. 4, 165.

FANGMAN W.L., NEIDHARDT F.C. (1964)
Demonstration of an altered aminoacyl Ribonucleic Acid synthetase in a Mutant of E.coli
J. Biol. Chem. 239, 1839.

FANGMAN W.L., NEIDHARDT F.C. (1964)
Protein and ribonucleic acid synthesis in a Mutant of Escherichia coli with an altered aminoacyl ribonucleic acid synthetase
J. Biol. Chem. 239, 1844-1847.

FEARON W.R., BELL E.A. (1955)
Canavanine : Detection and occurence in Colutea Arborescens
Biochem. J. 59, 221.

GALLANT J., CASHEL M. (1967)
On the mechanism of amino acid control of ribonucleic acid biosynthesis
J. Mol. Biol. 25, 545-553.

GALLANT J., SUSKIND S.R. (1962)
Ribonucleic acid synthesis and thymineless death
Biochim. Biophys. Acta. 55, 627-638.

GORINI L., KAUFMAN H. (1960)
Selecting Bacterial Mutants by the penicillin method
Science 131, 604.

GRAY C.H., TATUM E.L. (1944)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 30, 404.

GRENSON M., MOUSSET M., WIAME J.M., BECHET J. (1966)
Multiplicity of the amino-acid permeases in Saccharomyces cerevisiae
Evidence for a specific arginine transporting system
Biochim. Biophys. Acta. 127, 325-338.

GROS F., GALLANT J., WEISBERG R., CASHEL M. (1967)
Descryptification of RNA polymerase in whole cells of E.coli
J. Mol. Biol. 25, 555-557.

HOROWITZ N.H., SRB A.M. (1948)
Growth Inhibition of neurospora by canavanine and its reversal.
J. Biol. Chem. 174, 371.

HOWARD-FLANDERS P. (1968)
DNA Repair
Ann. Rev. Biochem. 37, 175-200.

JACOB F., BRENNER S., CUZIN F. (1963)
On the regulation of DNA replication in bacteria
Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 28, 329.

KITAGAWA M. (1937)
A di-amino acid, canavanin, and a mono amino acid, canalin
J. Biochem. Tokyo 25, 23.

KITAGAWA M., TOMIYAMAT (1929)
A new amino - compound in the Jack bean and corresponding new ferment
J. Biochem. Tokio. 11, 265.

KLEINSCHMIDT A.K., LAN D., ZAHN R.K. (1961)
Uber die Intrazelluläre formation von bakterien-DNS
I. Naturforsch. 166, 730-739.

KRUSE P.F., Mc COY T.A. (1958)
The competitive Effect of Canavanine on utilisation of Arginine in Growth of Walker carcinosarcoma 256 cells in vitro.
Cancer Research. 18, 279.

KRUSE P.F., WHITE P.B., CARTER H.A., Mc COY T.A. (1959)
Incroporation of canavanine into protein of Walker carcinosarcoma 256 cells cultured in vitro
Cancer Research. 19, 122.

LARK C., LARK K. (1964)
Evidence for two distinct aspects of the mechanism regulating chromosome replication in E.coli
J. Mol. Biol. 60, 120-136.

LARK K.G., REPKO T., HOFFMAN E.J. (1963)
The effect of amino-acid deprivation on subsequent deoxyribonucleic acid replication.
Biochim. Biophys. Acta. 76, 9-24.

LEDERBERG J., GERARD R.W. (1950)
Methods in medical research.
Yearbook publishers. P.5.

MAALØE O., HANAWALT C. (1961)
Thymine deficiency and the normal DNA replication cycle I.
J. Mol. Biol. 3, 144-155.

MAAS W.K. (1961)
Studies on repression of arginine biosynthesis in E.coli.
Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 26, 183.

Mc GRATH R.A., WILLIAMS R.W. (1966)
Reconstruction in vivo of irradiated Escherichia coli deoxyribonucleic acid the rejoining of broken pieces.
Nature 212, 534-535.

NOVICK R.P., MAAS W.K. (1961)
Control by endegenously synthesized arginine of the formation of ornithine transcarbamylase in E.coli.
J. Bact. 81, n° 2, 236-240.

PARDEE A.B., SHORE V.G., PRESTIDGE L.S. (1956)
Incorporation of azatryptophan into proteins of bacteria and bacteriophage.
Biochem. Biophys. Acta. 21, 406-407.

RASMUSSEN K.V.
Communication personnelle.

RATNER S., ROCHOVANSKY O. (1956)
Biosynthesis of Guanidinoacetic Acid. I Purification and properties of transamidinase.
Arch. Biochem. Biophys. 63, 277-295.

RICHMOND M.H. (1959)
Incorporation of canavanine by straphylococcus aureus 524 SC.
Biochem. J. 73, 261.

RICHMOND M.H. (1962)
The effect of aminoacid analogues on growth and protein synthesis in micro-organismes.
Bact. Rev. 26, 398.

ROBERTS R.B., COWIE O.B., ALBERSON P.H., BOLTON E.T., BRITTEN R.J. (1963)
In studies of biosynthesis in Escherichia coli.
Carnegie Institution of Washington - publication 607 - Washington D.C. p. 5.

ROUVIERE J., LEDERBERG S., GRANBOULAN P., GROS F. (1969)
Structural sites of RNA synthesis in E.coli.
J. Mol. Biol. 46, 413-430.

RYTER A. (1968)
Association of the nucleus and the membrane of bacteria : a morphological study.
Bact. Rev. 32, 1, 39-54.

RYTER A., HIROTA Y., JACOB F. (1968)
DNA-membrane complex and nuclear segregation in bacteria.
Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33, 669-676.

SCHACHTELE C.F., ANDERSON D.L., ROGERS P. (1968)
Mechanism of canavanine death in E.coli.
Membrane bound canavanyl protein and nuclear disruption.
J. Mol. Biol. 33, 861-872.

SCHACHTELE C.F., ROGERS P. (1965)
Canavanine death in E.coli.
J. Mol. Biol. 14, 474-489.

SCHARTZ J., MAAS W. (1960)
Analysis of the inhibition of growth produced by canavanine in E.coli.
J. bact. 6, 794-799.

SIMONNET G.M., CHAPEVILLE F. (1969)
Action de la canavanine sur la synthèse de RNA chez E. coli.
European J. Biochem. 9, 199-206.

SIMONNET G.M., PARESYS-RICHLI M. (1972)
Relation entre l'altération de la structure de l'ADN et la viabilité d'E.coli
en présence de canavanine (sous presse).

SIMONNET G.M., PARESYS-RICHLI M., SENTENAC A. (1972)
Pénétration de la canavanine dans différents types de cellules.
Arch. des Sciences physiologiques. (sous presse).

STRATLING W., KNIPPERS R. (1971)
Properties of the DNA synthesizing activity in DNA-membrane complexes from bacteria cell extracts.
Eur. J. Biochem., 20, 330-339.

VOLCANI B.E., SNELL E.E. (1948)
The effects of canavanine, arginine and related compounds on the growth of bacteria.
J. Biol. Che. 174, 893-902.

VYAS S., MAAS W.K. (1963)
Feedback inhibition of acetylglutamate synthetase by arginine in E.coli.
Arch. Biochem. biophys., 100, 542-546.

Manuscrit reçu le 13 janvier 1972